

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-349881

(43) 公開日 平成4年(1992)12月4日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/16	B	7823-4B		
C 0 7 H 21/04	B	7822-4C		
C 0 7 K 13/00		7731-4H		
C 1 2 N 1/21		7236-4B		
		8828-4B		
			C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数20(全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平3-39591	(71) 出願人	391008788 アボット・ラボラトリーズ ABBOTT LABORATORIES アメリカ合衆国60064-3500イリノイ州ア ボット・パーク、ワン・アボット・パー ク・ロード (番地の表示なし)
(22) 出願日	平成3年(1991)2月7日	(72) 発明者	ウラジミール・マンデツキー アメリカ合衆国60048イリノイ州リバティ ービル、ヘムロック・レイン516番
(31) 優先権主張番号	4 7 6, 1 9 9	(72) 発明者	メアリー・アン・シャルクロス アメリカ合衆国60030イリノイ州グレイス レイク、メインセイル・ドライブ133番
(32) 優先日	1990年2月7日	(74) 代理人	弁理士 青山 葆 (外1名)
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 比活性の向上した合成アルカリホスファターゼ

(57) 【要約】

【目的】 温度安定性を保持したまま、比活性の増大したアルカリホスファターゼを調製する。

【構成】 大腸菌により産生されたアルカリホスファターゼであって、野生型の大腸菌アルカリホスファターゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を有することを特徴とする合成酵素、該合成酵素をコードするDNA配列、該DNA配列を含むプラスミド、該プラスミドで形質転換した形質転換細胞、および該酵素を含む指示試薬を用いた結合アッセイ法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 大腸菌により産生されたアルカリホスファターゼであって、野生型の大腸菌アルカリホスファターゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を有することを特徴とする、合成酵素。

【請求項2】 アミノ酸変異が、該酵素の活性部位の約20Å以内、好ましくは該活性部位の約10Å以内、より好ましくは該活性部位内に存在する、請求項1に記載の合成酵素。

【請求項3】 アミノ酸変異が、Thr¹⁰⁰の代わりのVal、Thr¹⁰⁰の代わりのIle、Lys³²⁸の代わりのArg、Val⁹⁹の代わりのAla、Ala¹⁰³の代わりのAsp、Thr¹⁰⁷の代わりのValおよびAsp¹⁰¹の代わりのSerよりなる群から選ばれたものである、請求項1に記載の合成酵素。

【請求項4】 アミノ酸変異が、Val⁹⁹の代わりのAlaおよびLys³²⁸の代わりのArg、またはVal³⁷⁷の代わりのAlaおよびSer⁴¹⁵の代わりのGlyよりなる群から選ばれたものである、請求項1に記載の合成酵素。

【請求項5】 単細胞宿主中で発現するためのアルカリホスファターゼをコードするヌクレオチド配列を有する遺伝子操作したDNA配列であって、該アルカリホスファターゼが野生型の大腸菌アルカリホスファターゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を有し、野生型の大腸菌アルカリホスファターゼよりも大きな比活性を有することを特徴とする、DNA配列。

【請求項6】 アミノ酸変異が、該酵素の活性部位の約20Å以内、好ましくは該活性部位の約10Å以内、より好ましくは該活性部位内に存在する、請求項5に記載のDNA配列。

【請求項7】 アミノ酸変異が、Thr¹⁰⁰の代わりのVal、Lys³²⁸の代わりのArg、Val⁹⁹の代わりのAla、Ala¹⁰³の代わりのAsp、Ala¹⁰³の代わりのCys、Thr¹⁰⁷の代わりのValおよびAsp¹⁰¹の代わりのSerよりなる群から選ばれたものである、請求項5に記載のDNA配列。

【請求項8】 アミノ酸変異が、Val⁹⁹の代わりのAlaおよびLys³²⁸の代わりのArg、またはVal³⁷⁷の代わりのAlaおよびSer⁴¹⁵の代わりのGlyよりなる群から選ばれたものである、請求項5に記載のDNA配列。

【請求項9】 単細胞宿主が、大腸菌株、バシラス属、ストレプトマイセス属、哺乳動物細胞、酵母および他の真菌細胞よりなる群から選ばれたものである、請求項5に記載のDNA配列。

【請求項10】 単細胞宿主中で発現するためのアルカリホスファターゼをコードする遺伝子操作によるDNA配列を含むプラスミドであって、該アルカリホスファターゼが野生型の大腸菌アルカリホスファターゼと比べて

少なくとも1つのアミノ酸変異を有し、野生型の大腸菌アルカリホスファターゼよりも大きな比活性を有することを特徴とする、プラスミド。

【請求項11】 アミノ酸変異が、該酵素の活性部位の約20Å以内、好ましくは該活性部位の約10Å以内、より好ましくは該活性部位内に存在する、請求項10に記載のプラスミド。

【請求項12】 アミノ酸変異が、Thr¹⁰⁰の代わりのVal、Thr¹⁰⁰の代わりのIle、Lys³²⁸の代わりのArg、Val⁹⁹の代わりのAla、Ala¹⁰³の代わりのAsp、Ala¹⁰³の代わりのCys、Thr¹⁰⁷の代わりのValおよびAsp¹⁰¹の代わりのSerよりなる群から選ばれたものである、請求項10に記載のプラスミド。

【請求項13】 アミノ酸変異が、Val⁹⁹の代わりのAlaおよびLys³²⁸の代わりのArg、またはVal³⁷⁷の代わりのAlaおよびSer⁴¹⁵の代わりのGlyよりなる群から選ばれたものである、請求項10に記載のプラスミド。

【請求項14】 単細胞宿主が、大腸菌株、バシラス属、ストレプトマイセス属、哺乳動物細胞、酵母および他の真菌細胞よりなる群から選ばれたものである、請求項10に記載のプラスミド。

【請求項15】 単細胞宿主中で発現するためのアルカリホスファターゼをコードする遺伝子操作によるDNA配列を含むプラスミドで形質転換した単細胞宿主であって、該アルカリホスファターゼが野生型の大腸菌アルカリホスファターゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を有し、野生型の大腸菌アルカリホスファターゼよりも大きな比活性を有することを特徴とする、宿主細胞。

【請求項16】 アミノ酸変異が、該酵素の活性部位の約20Å以内、好ましくは該活性部位の約10Å以内、より好ましくは該活性部位内に存在する、請求項15に記載の宿主細胞。

【請求項17】 アミノ酸変異が、Thr¹⁰⁰の代わりのVal、Thr¹⁰⁰の代わりのIle、Lys³²⁸の代わりのArg、Val⁹⁹の代わりのAla、Ala¹⁰³の代わりのAsp、Ala¹⁰³の代わりのCys、Thr¹⁰⁷の代わりのValおよびAsp¹⁰¹の代わりのSerよりなる群から選ばれたものである、請求項15に記載の宿主細胞。

【請求項18】 アミノ酸変異が、Val⁹⁹の代わりのAlaおよびLys³²⁸の代わりのArg、またはVal³⁷⁷の代わりのAlaおよびSer⁴¹⁵の代わりのGlyよりなる群から選ばれたものである、請求項15に記載の宿主細胞。

【請求項19】 大腸菌株、バシラス属、ストレプトマイセス属、哺乳動物細胞、酵母および他の真菌細胞よりなる群から選ばれたものである、請求項15に記載の宿主細胞。

【請求項20】 試料中の分析対象物の存在または量を決定する方法であって、(a)試料を、特異的結合成分に直接または間接に結合したアルカリホスファターゼであって、野生型の大腸菌アルカリホスファターゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を有し、野生型の大腸菌アルカリホスファターゼよりも大きな比活性を有することを特徴とするアルカリホスファターゼからなる指示試薬、および捕捉結合成分と連続的または同時に混合し、(b)該指示試薬を分析対象物、該捕捉試薬および補助特異的結合成分よりなる群から選ばれたものに結合させて指示試薬複合体を生成させ、ついで(c)該指示試薬複合体または遊離の指示試薬を酵素基質と反応させて検出可能なシグナルを生成させることにより試料中の分析対象物の存在または量を決定することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、生物学的性質を改善するための酵素の修飾に関する。さらに詳しくは、遺伝子操作した大腸菌を用いて産生したアルカリホスファターゼに関する。本発明のアルカリホスファターゼは比活性が向上しており、かつ高い熱安定性を有しているため結合アッセイの標識として有利に用いることができる。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】アルカリホスファターゼは、容易に検出可能な標識酵素として種々の診断結合アッセイに用いられる。アルカリホスファターゼは、たとえば、不均質酵素結合アッセイにしばしば用いられ、このアッセイにおいて該酵素は、分析対象物の種類に依存して抗原、抗体、または目的の分析対象物に結合する他の特異的結合成分に結合される。結合後、新たに生成した結合複合体を反応混合物から分離し、該複合体に付随するアルカリホスファターゼの存在または量を観察することにより該複合体を検出することができる。アルカリホスファターゼは、酵素基質を加え、得られた酵素/基質反応の程度を観察することにより検出する。

【0003】標識として使用するために特定の酵素を選択する基準は、高い比活性(すなわち、高い触媒速度または高速の酵素反応);高温(通常、50~60℃を越える融解温度)での安定性;特異的結合成分に結合した後の酵素の安定性;酵素検出反応に使用するため容易に定量できる酵素基質を利用できること;反応生成物増幅法を利用できること;およびアッセイが適切な性能を有すること(たとえば、バックグラウンド読み取りなど)などが挙げられる。酵素の多くの工業的応用にとって主な関心事となるのは温度安定性である。タンパク質は、その温度安定性により種々のものがあり、種々の酵素の融解温度(T_m)は40℃未満から100℃を越えるものまである。

【0004】ウシ腸管アルカリホスファターゼは酵素標

識としてしばしば用いられ、高い比活性および約55℃の融解温度の両方を示す。この酵素およびその結合体は結合アッセイに都合よく用いることができ、検出反応の生成物を増幅する幾つかの方法がある。しかしながら、ウシ腸管アルカリホスファターゼの使用は依然として不利な点が幾つかある。これら欠点としては、幾つかの酵素調製物の純度が不適當であること、および共有結合的に結合した炭水化物の存在が挙げられ、これらはアッセイ結果を決定する場合に高いバックグラウンド読み取りを引き起こすと思われる。さらに、ウシ腸管アルカリホスファターゼは、結合アッセイに使用するために特異的結合成分に結合させた後は温度安定性が不良である。これらの欠点のため、多くの研究者が、結合アッセイ(とりわけ高い温度条件で行われるアッセイ)に一層適した比活性および温度安定性の両方を備えた新しい形態のアルカリホスファターゼの研究開発を行ってきた。

【0005】哺乳動物酵素の上記欠点を克服するために選択された一つの方法は、大腸菌のアルカリホスファターゼを使用することによるものであり、大腸菌のアルカリホスファターゼは哺乳動物のアルカリホスファターゼに比べれば極めて高い温度安定性を有する。大腸菌アルカリホスファターゼは、約95℃の T_m を有する。アルカリホスファターゼはまた、対応遺伝子のコピーが細胞当たりにも多数存在しておれば大腸菌から大量に発現することができる。さらに、この酵素は数工程で精製して均質にすることができる。しかしながら、大腸菌アルカリホスファターゼは、ウシ腸管アルカリホスファターゼに比べると比活性が低い。大腸菌アルカリホスファターゼの触媒反応の最大速度(k_{cat})は、かなりの変化が認められるが、60 sec⁻¹である。これは、ウシ腸管アルカリホスファターゼの約2,000 sec⁻¹の k_{cat} と比較される。天然の大腸菌アルカリホスファターゼはウシ腸管アルカリホスファターゼに比べると触媒速度が低いので、好ましい温度安定性特性を保持したまま大腸菌アルカリホスファターゼの酵素活性を向上させることが有利である。

【0006】プロテインエンジニアリングの分野における最近の進歩、たとえば、部位特異的(site-directed)突然変異誘発、コンピューターによる分子設計、遺伝子発現法、および結晶構造または核磁気共鳴構造の利用などにより、酵素の特定の性質を修飾することを目指したプロジェクトを組むことが可能となった。修飾し得る酵素の特性は、大きく2つのクラスに分けられる。すなわち、(1)酵素活性部位の局所的な性質に依存する特性、たとえば基質特異性、触媒反応の速度(k_{cat})、およびミハエリス定数(K_m)など;および(2)酵素構造の全体的な性質に依存する特性、たとえば温度安定性、タンパク質分解に対する抵抗性、および活性部位のアロステリック制御などである。酵素の活性部位は、一般に約10アミノ酸残基からなる。一般に、活性部位のアミノ酸

は、活性部位で起こる過程を確立する。それゆえ、活性部位を構成するアミノ酸残基を変えることにより、酵素の触媒活性を変えることができる。

【0007】アルカリホスファターゼの性質を修飾する初期の努力は、主として酵素の化学的修飾に基づくものであった。たとえば、酵素を光酸化に供したり、モノおよびジクロロアセチル-β-グリセロリン酸；2,3-ブタンジオール；フェニルグリオキサールや他の化合物で処理した。一般に、これらの処理により酵素の触媒活性は低減するかまたは消失されるので、その酵素の機能に関する情報が得られた[コールマン(Coleman)およびゲッティングス(Gellings)、Adv. Enzymol. 55: 351、1983]。この酵素をテトラニトロメタンで処理し(チロシル残基をニトロ化する)、その後、該ニトロ化残基をアミノチロシルに還元すると、酵素のホスホヒドロラーゼ活性は非修飾タンパク質の活性の130%まで上昇し、一方、ホスホトランスフェラーゼ活性は標準値の350%となった[クリステン(Christen)ら、Biochemistry 10: 1377、1971]。そのような実験は、アルカリホスファターゼのある種の酵素的性質が該酵素の化学的修飾により改良され得ることを示していた。しかしながら、化学的修飾法は、酵素中のどのアミノ酸を修飾するかに関して選択の余地が少なく、それゆえ、広スペクトルのアミノ酸残基が影響を受け得る。

【0008】さらに、タンパク質の活性部位または結合部位における変化は、単一アミノ酸の変化(すなわち、点変異)よりも一層大きな変化をもたらす。たとえば、遺伝子発現を抑制するタンパク質(リプレッサー)は、幾つかの酸性残基を変えることによりアクチベーターに変え得る[マ(Ma)およびプタシュネ(Ptashne)、Cell 48: 487~853、1987]。トリプトファンシセターゼのαサブユニットにおける研究で示されるように[ユタント(Yulant)ら、Nature 267: 274~275、1977]、たいていの突然変異はT₆を下げる。にもかかわらず、バシラス・ステアロサーモフィルス(Bacillus stearothermophilus)の中性プロテアーゼにおける研究結果に示されるように[イマナカ(Imanaka)ら、Nature 324: 695~697、1986]、酵素配列の幾つかのアミノ酸の置換により酵素のT₆を有意に高め得る。

【0009】組換えDNA法の出現により、アルカリホスファターゼの生成を指令する遺伝子(phoA遺伝子)の修飾によって特定のアミノ酸残基を修飾または変える(部位特異的突然変異誘発)ことが可能になった。大腸菌では、phoA遺伝子は、リン酸基の結合、移動および代謝に関与する少なくとも18個の遺伝子からなる非連続的な一群の一部をなしている。大腸菌phoA遺伝子のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、当業者にはよく知られている[チャング(Chang)、Gene 44: 121~125、1986参照]。

【0010】遺伝子操作により、アルカリホスファターゼ酵素の活性部位にあるセリン¹⁰²の変異は比活性の1000倍の低下となり、それゆえ、このアミノ酸残基がアルカリホスファターゼ活性に重要であることが示された[バットラー-ランソホフ(Batler-Ransohoff)ら、1989年度アルカリホスファターゼシンポジウム、サンジェゴ、CA、1989の要約]。これに対して、セリンのシステインによる置換(水酸基を保持している)は、わずかに活性を低下させたにすぎなかった[ゴーシュ(Ghosh)ら、Science 231: 145、1986]。酵素活性部位の直ぐ近傍の残基であるアルギニン¹⁰⁶の役割についても突然変異誘発により調べられ、触媒効率が天然の酵素に比べて約50倍低下した[バットラー-ランソホフら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 4276、1988およびチャイダログロー(Chaidaroglou)ら、Biochemistry 27: 8338、1988]。アルカリホスファターゼのアミノ末端の10~40個のアミノ酸残基をタンパク質加水分解により除去すると、温度安定性は低下するが酵素の比活性は変化しないかまたは低下してもわずかであることも示された[クレボウスキー(Chlebowski)ら、J. Biol. Chem. 264、4523; 1989]。phoA遺伝子の幾つかのサイレント突然変異も野生型大腸菌の単離物から示されている[デュボース(DuBose)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7036、1988]。ごく最近では、大腸菌アルカリホスファターゼの活性部位のアスパラギン酸¹⁰¹の機能が部位特異的突然変異誘発によって調べられ、その際、該アミノ酸をアラニンで置換した(チャイダログローら、Protein Engineering 3(2): 127~132、1989)。この変異酵素は野生型の酵素に比べて約3倍高い活性を示したが、熱安定性の実質的な低下も示した。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明は、野生型酵素と比べて高い比活性を有するアルカリホスファターゼの産生を制御する合成遺伝子の構築を包含する。本発明の新規酵素の酵素活性は、野生型の酵素と比べて36倍も上昇している。本発明の新規酵素は野生型酵素に比べて熱安定性は低いとはいえ、該酵素を結合アッセイに使用するのに適した程度に、すなわち通常のアッセイ条件下で熱不活化されない程度に熱安定性は保持されている。本発明の新規酵素、該酵素を製造するための新規DNA配列、該遺伝子操作によるDNA配列を含有する新規プラスミド、および該酵素を指示試薬として利用したアッセイを記載する。

【0012】たとえば、大腸菌によって産生される合成アルカリホスファターゼであって、野生型の大腸菌アルカリホスファターゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を有し、野生型大腸菌アルカリホスファターゼと比べて高い比活性を有する新規酵素を記載する。一般に、

アミノ酸変異は酵素の活性部位の約20Å内に生じさせる。アミノ酸変化の例としては、Thr¹⁰⁰の代わりのVal、Thr¹⁰⁰の代わりのIle、Lys³²⁸の代わりのArg、Val⁹⁹の代わりのAla、Ala¹⁰³の代わりのAsp、Ala¹⁰³の代わりのCys、Thr¹⁰⁷の代わりのValおよびAsp¹⁰¹の代わりのSerが挙げられる。二重アミノ酸変化の例としては、Val⁹⁹の代わりのAlaおよびLys³²⁸の代わりのArg、またはVal³⁷⁷の代わりのAlaおよびSer⁴¹⁵の代わりのGlyを含むアミノ酸変異が挙げられる。

【0013】本発明は、アルカリホスファターゼ(野生型の大腸菌アルカリホスファターゼと比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を有し、野生型大腸菌アルカリホスファターゼと比べて高い比活性を有する)をコードする一連のコドンを含む、ベクター内に挿入するのに適した新規なDNA配列を包含する。そのようなDNA配列を含むプラスミド、およびそのようなプラスミドを含む宿主細胞も記載する。単細胞宿主を用い、一般に細菌および大腸菌、真菌株、たとえばバシラス属、ストレプトマイセス属、哺乳動物細胞、酵母および他の真菌などから

選択する。すべての宿主が等しく有効であるというわけ*

略語	アミノ酸名
Ala	アラニン
Arg	アルギニン
Asn	アスパラギン
Asp	アスパラギン酸(アスパラギン酸塩)
Cys	システイン
Gln	グルタミン
Glu	グルタミン酸(グルタミン酸塩)
Gly	グリシン
His	ヒスチジン
Ile	イソロイシン

【0016】本発明は、天然の酵素に備わる所望の熱安定性特性は保持しながら、比活性を向上させた合成アルカリホスファターゼを提供する。遺伝的に修飾した酵素はウシ腸管アルカリホスファターゼよりも熱安定性が大きく、75℃(pH7.5)で5分間の最小半減期を示す。さらに、アッセイ条件に依存して、本発明の新規酵素の酵素活性は天然のものに比べて1.5~36倍上昇している。酵素活性の最大の増加は、低濃度のトリス(0.05M)かまたはジエタノールアミン(0.05M)の存在下、約10のpHで酵素活性を測定したときに観察される。比活性の向上は、分子設計(molecular modeling)、遺伝子工学および部位特異的突然変異誘発の組み合わせにより達成した。

【0017】一般に、アルカリホスファターゼ中で変異させる目的部位は、該酵素の結晶構造に基づいて前以て決定した[ソワドスキー(Sowadski)ら、J. Mol. Biol. 186、417~433; 1985]。目的部位として所定のアミノ酸を選択する基準は、酵素分子の活性部位

*ではないが、宿主の選択は本発明にとって重要ではない。

【0014】さらに、本発明は、そのような合成酵素を結合アッセイにおいて酵素標識として使用することを包含する。試料中の分析対象物の存在または量を決定するのに有用な指示試薬は、特異的結合成分を本発明の酵素に直接または間接に結合することにより調製することができる。得られた指示試薬は、サンドイッチアッセイ、競合アッセイおよび直接および間接アッセイ態様を含む(しかし、これらに限られるものではない)種々のアッセイ態様に使用するのに適している。

【0015】塩基コードおよびアミノ酸を示すため、下記記号および略語を用いる。

塩基コード:

記号	ヌクレオチド
A	アデノシン
C	シトシン
G	グアニン
T	チミン

アミノ酸の3文字略語:

略語	アミノ酸名
Leu	ロイシン
Lys	リシン
Met	メチオニン
Phe	フェニルアラニン
Pro	プロリン
Ser	セリン
Thr	トレオニン
Trp	トリプトファン
Tyr	チロシン
Val	バリン

に近いアミノ酸、とりわけ触媒残基のSer¹⁰²に近いアミノ酸を選択することであった。

【0018】酵素中の所定部位に一定のアミノ酸変化を生じさせるため、そのアミノ酸をコードする適当なコドンを用いてphoA遺伝子中に挿入した。コドン配列NNN(Nは4種のヌクレオチドのいずれかを示す)をDNA配列中に挿入することにより、ランダムなアミノ酸変化も生じさせた。幸運なことに、構築した一つの変異体が2つの点変異(すなわち、2つのアミノ酸変化)を含んでおり、これは遺伝子合成に用いた合成オリゴヌクレオチドの化学的修飾の結果であると思われた。

【0019】新規プラスミドの構築

適切に変異させたDNA分子の最初のセットが得られたら、2つのタンパク質設計法を用いて変異酵素を製造した。まず、種々の修飾DNAサブ配列を単一遺伝子中に導入し、得られたクローンを比活性の高い変異酵素の産生についてスクリーニングした。第二に、変異DNA分子を、2回目の突然変異誘発用に用いた。

【0020】第一の方法には、アルカリホスファターゼをコードする完全合成遺伝子を設計し構築することが含まれていた。合成phoA遺伝子の合成は、本願出願人による米国特許出願第131,973号(1987年12月11日出願)明細書およびマンデッキ(Mandecki)およびボリング(Bolling)のGene 68、101~107、1988(これら文献を参照のため本明細書に引用する)に記載されたFok I法により行った。21の合成オリゴヌクレオチド[第1(a)図~第1(c)図]を設計し、通例に従って設計したプラスミドベクター(pWM500)中にそれぞれクローニングした。ついで、Fok I制限酵素を用い、各合成オリゴヌクレオチドをベクターから切断した。得られたDNA断片は、ベクターからの開裂後に、21のすべての断片が1回の反応でライゲートして約1600塩基対の合成phoA遺伝子を調製することを可能にする独特の配列を各断片の突き出し末端に有しているように設計した。

【0021】上記合成遺伝子には、翻訳(遺伝子の塩基配列がポリペプチド鎖のアミノ酸配列に翻訳される機構)開始のためのphoAリボソーム結合部位および転写ターミネーター部位配列(ここで遺伝子に相補的なmRNAの合成が終止する)が含まれていた。この合成遺伝子を合成プラスミドベクター(pWM518)(実施例11に構築を示す)中にクローニングした。このベクターは、クローニング、発現および突然変異誘発などの手順を容易にするため限られた数の制限部位を有するように設計されていた。合成phoA遺伝子を有するプラスミド(pMA100)からのアルカリホスファターゼの発現レベルは、550nmでの光学密度1.5まで増殖させた細胞(11)からタンパク質10mgに達した。染色体アルカリホスファターゼ遺伝子の欠失した大腸菌株を形質転換に用い、引き続き発酵させて本発明の新規酵素を製造した。そのような大腸菌株としては、イノウエ(Inouye)らのJ. Mol. Biol. 110、75~87(1977)(参照のため本明細書に引用する)に記載されているように、MZ13b(F⁻lacX74、Δ(brnQ⁺、phoA⁻、phoB⁻、proC⁻)₂₄tsxR、trp⁺、str^R、Φ80D(proC⁺、proB⁺)₁₈v₃、Φ80)大腸菌株が挙げられる。

【0022】得られた変異大腸菌をスクリーニングしてどのクローンが比活性の高いアルカリホスファターゼを産生するかを決定するため、生物学的アッセイを用いた。これらのクローンを、基質である5-ブプロモ-4-クロロ-3-インドールリン酸(BCIP)を含有する培地で増殖させた。比活性の高いアルカリホスファターゼを産生するコロニーは、基質との酵素反応により青色を呈したコロニーにより検出した。

【0023】宿主細胞によるアルカリホスファターゼの高発現レベルは、指示プレート上でコロニーをカラースクリーニングするのに不利である(発現レベルの低上昇は濃い青色の色変化として示されない)。それゆえ、変

異酵素を天然様酵素から識別するのを助けるため、天然のphoAリボソーム結合部位を、天然のリボソーム結合部位と相同であるが翻訳開始が有効でない配列で置換することによりプラスミドのアルカリホスファターゼ発現レベルを減少させた。得られたプラスミドをpMA101と称した。このphoA遺伝子は、イニシエーターATGコドンの上流に一群の5つのランダムヌクレオチドを含んでいた。その結果、酵素の発現は実質的に減少し、高い比活性を有する変異酵素のみがBCIP基質との反応で濃い青色を呈した。種々のアルカリホスファターゼ活性レベルを発現する約1,000クローンを含むクローンライブラリーが得られた。カラースクリーニングに適したアルカリホスファターゼ活性を発現するクローン(pMA101)を、さらに突然変異誘発研究に用いるため選択した。

【0024】部位特異的突然変異誘発

オリゴヌクレオチド特異的二本鎖切断修復法[マンデッキらのProc. Natl. Acad. Sci. 83、7177~7181(1986)](該文献を参照のため本明細書に引用する)を用い、合成プラスミドベクターを構築した。しかしながら、この特定の方法を用いることは本発明には重要ではない。この方法には、変性させた直線状プラスミド、および適当な変異をコードし該プラスミド切断の近傍のプラスミドDNA配列に相同な2つの「アーム」を有する合成オリゴヌクレオチド配列とで大腸菌細胞を同時形質転換することにより変異を導入することが含まれていた。一本鎖オリゴヌクレオチド配列のみを変異誘発に用いるので、この方法は縮重配列をプラスミドDNA中に導入するのに特に有利である。

【0025】この方法において、合成オリゴヌクレオチドサブ配列(アルカリホスファターゼ遺伝子のサブ配列中に変異をコードする)をプラスミドベクターのphoA遺伝子中にクローニングしてphoA遺伝子を修飾(置換ではなく)した。合成オリゴヌクレオチドサブ配列は、目的部位に一定のコドン配列かまたはランダムコドン配列(一般に20アミノ酸鎖に対応する)を選び込むように設計した。サブ配列を導入するため、phoA遺伝子を含有する大腸菌プラスミドを変異誘発の目的部位の隣で開裂するか(すなわち、プラスミドを1カ所のみで開裂する制限エンドヌクレアーゼで切断、phoA遺伝子内にはそのような部位が25存在する)、またはプラスミドを2つの酵素で開裂して変異誘発する部位とオーバーラップする制限断片を放出させた。宿主細胞を上記開裂プラスミド、合成オリゴヌクレオチドおよびDNAリガーゼと混合することにより、宿主細胞を形質転換した。1回の形質転換から200のコロニーが得られた。

【0026】カラースクリーニングの後、DNAシーケンシングおよび精製タンパク質の分析を行って、比活性の増大したアルカリホスファターゼを発現する遺伝子を含有する10の変異大腸菌株が得られた。これら10

の変異株は、Thr¹⁰⁰>Val(すなわち、100位のトレオニンがバリンで置換)；Thr¹⁰⁰>Ile；Lys³²⁸>Arg；Val⁹⁹>Ala；Asp¹⁰¹>Ser；Ala¹⁰³>Asp；Ala¹⁰³>Cys；Thr¹⁰⁷>Val；二重変異体Lys³²⁸>ArgおよびVal⁹⁹>Ala；および偶然の二重変異体Val³⁷⁷>AlaおよびSer⁴¹⁵>Glyであった。

【0027】上記遺伝的変異を含むプラスミドクローニングベクターを製造する別法もまた用いることができ、たとえば、ポリスキー(Polisky)らのProc. Natl. Acad. Sci. USA, 73(11), 3900~3904(1976)；シーワート(Siewert)らの米国特許第4,375,514号明細書；およびイタクラ(Itakura)らの米国特許第4,704,362号明細書等(これら文献を参照のため本明細書に引用する)に記載された方法が挙げられる。

【0028】アルカリホスファターゼ変異体の分析

比活性および温度安定性の分析を、高度に精製したタンパク質物質について行った。簡単に説明すると、精製*

第1表(構築した変異株)

プラスミド	変異	比活性 ($\mu\text{Mol}/\text{mg}/\text{分}$)	K _m (μM)	温度安定性 (半減期)
pMA100	野生型	60	30	95℃で6分間
pMA110	Val ³⁷⁷ >Ala Ser ⁴¹⁵ >Gly	90	23	80℃で7分間
pMA111	Thr ¹⁰⁰ >Val	123	20	85℃で21分間
pMA112	Thr ¹⁰⁰ >Ile	123	20	85℃で10分間
pMA113	Lys ³²⁸ >Arg	220	94	85℃で10分間
pMA114	Val ⁹⁹ >Ala	205	22	80℃で15分間 85℃で3分間
pMA115	Asp ¹⁰¹ >Ser	290	56	80℃で14分間 85℃で2分間
pMA116	Lys ³²⁸ >Arg Val ⁹⁹ >Ala	190	74	75℃で5分間 85℃で<1分間
pMA117	Ala ¹⁰³ >Asp	133	144	85℃で22分間
pMA118	Ala ¹⁰³ >Cys	105	75	85℃で29分間
pMA119	Thr ¹⁰⁷ >Val	240	102	85℃で7分間
ウシ腸管アルカリホスファターゼ		1800	10	65℃で9分間

【0031】アルカリホスファターゼ標識を用いた結合アッセイ

結合アッセイの標識としてのアルカリホスファターゼの使用を記載する前に、幾つかの術語を定義する。本発明の新規酵素標識を有利に用いることのできる種々のアッセイについても記載する。「特異的結合成分」とは、特異的結合ペア(すなわち一方の分子が他方の分子に化学的または物理的手段により特異的に結合する2つの異なる分子)の成分をいう。抗原と抗体との特異的結合ペアに加えて、他の特異的結合ペアとしては、ピオチンとアビジン、炭水化物とレクチン、相補的ヌクレオチド配列、相補的ペプチド配列、エフェクター分子とレセプタ

*法には、スフェロプラストの生成、硫酸アンモニウム沈殿およびクロマトフォーカス(chromatofocusing)クロマトグラフィーによるペリプラスムタンパク質の放出が含まれていた。比活性およびミハエリス定数の測定は、酵素基質(たとえば、p-ニトロフェニルホスフェートなど)が変換して色原体生成物を生成する速度をモニターすることに基づいて行った。温度安定性の測定は、種々の温度での酵素活性の失活をモニターすることにより行った。

【0029】得られた本発明の新規酵素およびそれらの性質を第1表にまとめて示す。すべての変異大腸菌株が、天然酵素(pMA100として示してある)よりも高い比活性を有するアルカリホスファターゼを発現した。各変異酵素の温度安定性は天然酵素に比べると低かったが、すべての変異酵素において、哺乳動物細胞の酵素であるウシ腸管アルカリホスファターゼよりは温度安定性が有意に高かった。

【0030】

一分子、酵素コファクターと酵素、ペプチド配列と該配列もしくは全タンパク質に特異的な抗体、ポリマー酸および塩基、染料とタンパク質結合剤、ペプチドと特異的タンパク質結合剤(たとえば、リボヌクレアーゼとS-ペプチドおよびリボヌクレアーゼとS-タンパク質など)などが挙げられる。さらに、特異的結合成分には、もとの特異的結合成分の類似体、たとえば分析対象物類似体なども含まれる。特異的結合成分が免疫反応物であるときは、たとえば、抗体、抗原、ハプテン、またはそれらの複合体であってよい。抗体を使用するときは、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、組換えタンパク質または抗体、それらの混合物または断片、並び

に抗体と他の特異的結合成分との混合物であってよい。そのような抗体の調製法および特異的結合成分として使用するのに適していることは、当業者にはよく知られている。

【0032】「分析対象物」とは、アッセイで検出すべき化合物または組成物をいう。分析対象物は、分析対象物特異的結合成分が天然に存在するかまたは分析対象物特異的結合成分を調製することのできるあらゆる物質であってよい。分析対象物の例としては、毒素、有機化合物、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸、ホルモン、ステロイド、ビタミン、薬物(治療目的で投与されるものおよび不法目的で投与されるものを含む)、これら物質のいずれかの代謝物、またはこれら物質のいずれかに対する抗体などが挙げられるが、これらに限られるものではない。「分析対象物」にはまた、イムノアッセイの目的となる抗原性物質、ハプテン、抗体、またはそれらの組み合わせも含まれる。本発明の試薬および方法はまた、食品産物および環境分析物を測定するために設計することもできる。

【0033】「指示試薬」とは、標識に結合した特異的結合成分をいう。指示試薬は、試料中の分析対象物の量に相関した検出可能なシグナルを生成する。一般に、指示試薬は、指示試薬が固相物質上に固定化された後に検出または測定するが、遊離または未結合の指示試薬も検出または測定してアッセイ結果を決定することもできる。指示試薬の特異的結合成分は、上記いずれかの特異的結合ペアの成分であってよい。本発明では、指示試薬の標識成分は比活性の向上した合成アルカリホスファターゼである。酵素標識は、酵素基質を検出可能な生成物に変換するために用いる。この生成物は視覚手段または器具により検出することができる。この酵素を1または2以上の基質または別の酵素と反応させて検出可能な反応生成物を生成させることにより、検出可能なシグナルを増幅することもできる。

【0034】「捕捉結合成分」とは、分析対象物または指示試薬に直接または間接に結合することができ、捕捉結合成分を試料または他のアッセイ試薬から分離できるように、共有結合、非共有結合、吸着または非特異的結合機構により固相に固定化されているかまたは固定化し得るかまたは沈殿させ得る特異的結合成分をいう。

【0035】「捕捉試薬」とは、固相物質に直接または間接に結合して、未結合の分析対象物およびアッセイ試薬から捕捉結合成分および該捕捉結合成分に結合した分析対象物または指示試薬を分離できる捕捉結合成分をいう。一般に、捕捉結合成分の固相物質への結合は実質的に可逆的なものであり、共有結合機構を含む。しかしながら、本発明の捕捉試薬は不溶性の固相物質に結合した捕捉結合成分に限られるものではない。凝集アッセイ法においては、捕捉試薬の捕捉結合成分はウシ血清アルブミンなどの可溶性担体に結合している。

【0036】「固相物質」とは、特異的結合成分を固定化するのに使用する当業者によく知られた適当なクロマトグラフィー物質、吸湿性物質、多孔質物質または毛管物質または他の通常の固体物質などをいう。本発明においては、固相物質は、1または2以上のアッセイ試薬を含有する1または2以上の層を有するフロースルー(flow-through)アッセイ装置で使用するための繊維ガラス、セルロースまたはナイロンパッド;ディップアンドリード(dip and read)アッセイのためのディップスティック(dipstick);クロマトグラフィー法(たとえば、ペーパークロマトグラフィーまたはガラス繊維クロマトグラフィーなど)または薄層クロマトグラフィー(たとえば、ニトロセルロースクロマトグラフィーなど)に使用するための試験ストリップであって、固相物質の単一ストリップの別々のゾーン中に1またはすべての試薬が含まれているもの;または当業者によく知られた吸着物質などが含まれる。固相物質にはまた、ポリアクリルアミドビーズ、ポリスチレンビーズまたはチューブ、マグネチックビーズ、マイクロタイタープレートまたはガラスまたはプラスチック試験管なども含まれるが、これらに限られるものではない。

【0037】天然物質、合成物質または合成的に修飾した天然物質を固相物質として用いることができ、たとえば、多糖類(たとえば、紙、セルロースおよびセルロース誘導体(ジアゾベンジルオキシメチルセルロース、ニトロセルロース、2-アミノフェニルチオエーテルセルロースおよび酢酸セルロースなど)を含むセルロース物質など);シリカ;ケイ素粒子;不活化アルミナなどの無機物質、または他の無機の細碎し多孔質ポリマーマトリックス中に均一に分散させた物質などの無機物質(ポリマーとしては、塩化ビニル、塩化ビニルとプロピレンとのコポリマー、および塩化ビニルと酢酸ビニルとのコポリマーなどが挙げられる);天然の布(たとえば、綿など)および合成の布(たとえば、ナイロンなど);シリカゲル、アガロース、デキストランおよびゼラチンなどの多孔質ゲル;ポリアクリレートなどのポリマーフィルム;タンパク質結合膜;などが挙げられる。固相物質は、それ自体で妥当な強度を有しているか、または支持体により強度を付与し得るものでなければならず、また検出可能なシグナルの生成を干渉してはならない。

【0038】捕捉試薬の特異的結合成分は、場合により微粒子などの粒子に結合させることができる。これらの微粒子は固相物質として働き、カラム中に保持されるか、可溶性試薬と試料との混合物中に懸濁されるか、または別の固相ベース物質に保持され固定化される。「保持され固定化される」とは、微粒子が固相ベース物質に関して該固相ベース物質内のどここの位置にも実質的に移動できないことを意味する。微粒子は、ポリスチレン、ポリメチルアクリレート、ポリプロピレン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリアクリロニトリル、ポリカーボ

ネットまたは同様の物質からなるものを含む、あらゆる適当なタイプの粒子から当業者により選択することができる。微粒子のサイズは重要ではないが、固相ベース物質を用いるような場合には該固相ベース物質の平均孔径よりも小さい平均直径を有するのが好ましい。

【0039】本発明はまた、最初から固相に結合していなかった捕捉結合成分を含む捕捉試薬をも包含する。アッセイ成分の間で複合体生成が生じたら、固相を分離機構として用いることができる。たとえば、反応混合物を固相物質と接触させると、新たに生成した反応複合体は固相物質により保持される。この分離工程を行うために別法を用いることもでき、たとえば、それ自体が捕捉結合成分に結合する固相を用いること、捕捉結合成分に特異的な結合成分を固相に結合させること、または捕捉結合成分に結合した反対に荷電した物質を誘引し結合する荷電物質などの反応試薬を固相に結合することなどが挙げられる(本出願人による米国特許出願第150,278号(1988年1月29日出願)明細書、参照のため本明細書に引用する)。

【0040】「補助特異的結合成分」とは、捕捉結合成分および指示試薬の特異的結合成分の他に用いられる特異的結合成分であって検出可能な結合複合体の一部となるものをいう。1または2以上の補助特異的結合成分をアッセイに用いることができる。たとえば、指示試薬が補助特異的結合成分に結合することができ、該補助特異的結合成分が今度は分析対象物と結合することができるアッセイにおいて補助特異的結合成分を用いることができる。

【0041】「試料」とは、一般に、分析対象物を含有していると思われる、天然または人工的に調製した液体試験媒体をいう。試料は、一般に生物学的流体またはその希釈液である。分析対象物を測定する生物学的流体の例としては、血清、全血、血漿、尿、唾液、羊水、脊髄液、などが挙げられる。試料にはまた、液体試験媒体を生成するように修飾した固体物質(たとえば、毛髪、組織など)も含まれる。

【0042】所定の結合成分、補助結合成分または固相物質の選択は一般に本発明には重要ではないことが当業者には理解されるであろう。これら物質は、所定の分析対象物または試料に対して最適のアッセイ結果が得られるように選択する。

【0043】本発明の新規酵素は、固相不均質結合アッセイ(サンドイッチアッセイ法および競合アッセイ法の両方を含む)において有利に用いることができる。不均質結合アッセイ法は、結合反応の成分を結合させる固相の使用を含む。試料中の分析対象物の存在または量を示す標識を検出する前に、固相を反応混合物から除去することにより固定化反応成分を過剰の試料およびアッセイ試薬から分離させる。

【0044】固相サンドイッチアッセイにおいては、捕

捉試薬は一般に固相物質に結合させた捕捉結合成分を含む。たとえば、特異的結合成分は、固定化抗体(試料中の抗原分析対象物に結合する)であってもよいし、または固定化抗原(試料中の抗体分析対象物に結合する)であってもよい。この捕捉試薬を、分析対象物を含有していると思われる試料、および標識した第二の特異的結合成分からなる指示試薬(たとえば、標識抗分析対象物抗体)と混合する。これら試薬は、同時に混合することもできるし、単独または組み合わせて連続的に加えることもできる。結合反応の結果、捕捉試薬/分析対象物/指示試薬複合体が生成する。アッセイはまた、生成した複合体を過剰の試薬および試料から分離する工程をも含んでいてよい。指示試薬について固相を調べることにより、固相物質上に保持された複合体を検出する。試料中に分析対象物が存在しておれば、固相物質上に標識が存在するであろう。固相に結合した標識の量は、試料中の分析対象物の量に正比例する。

【0045】本発明のアッセイは、順行(forward)法、逆法および同時法を含む、いかなるサンドイッチアッセイ法を用いても行うことができる。一般に、順行アッセイ法は、試料を捕捉試薬に接触させた後、インキュベーション期間を置き、ついで指示試薬を加えることを含む。逆アッセイ法では、試料に指示試薬を加え、ついでインキュベーションの後で捕捉試薬を加える。同時アッセイ法は、捕捉試薬と指示試薬の両方ともを同時に試料と接触させる単一のインキュベーション工程を含む。

【0046】さらに、本発明の新規酵素は、捕捉試薬/分析対象物/分析対象物特異的結合成分/指示試薬からなる複合体を生成させて間接サンドイッチアッセイに用いることができる。この場合には、分析対象物特異的結合成分は補助特異的結合成分である。

【0047】本発明の新規酵素を用いて競合アッセイを行うこともできる。固相競合アッセイでは、捕捉試薬は一般に、固相物質に結合させた捕捉結合成分を含み、これを試料および指示試薬の両方に接触させる。しかしながら、指示試薬は、標識に結合させた分析対象物または分析対象物類似体から調製する。結合反応が起こり、その結果、(1)固定化捕捉試薬/分析対象物複合体、または(2)固定化捕捉試薬/指示試薬複合体が生成される。別法としては、固定化特異的結合成分が分析対象物または分析対象物類似体であり、これと試料の分析対象物とが指示試薬への結合について競合するようにすることもできる。競合アッセイにおいては、固相に結合した標識の量は試料中の分析対象物の量と逆の相関を有する。それゆえ、陽性の試料はシグナルが減少するであろう。

【0048】これらの結合アッセイにおいて、試料中の分析対象物の存在または量は、通常は固相に結合した標識の存在または量を検出することにより決定するが、遊離または未結合の指示試薬を検出することもできる。競合アッセイでは、試料中に存在する分析対象物の量が多

ければ多いほど、固相に結合する標識の量は減少する。サンドイッチアッセイでは、試料中の分析対象物の量が多ければ多いほど、固相に存在する標識の量は増大する。

【0049】下記の特定の実施例でも記載するように、本発明の幾つかの新規酵素を別の免疫グロブリンに化学的に結合させ、酵素イムノアッセイ(EIA)に使用するための結合体を生成させた。たとえば、プラスミドpMA110、pMA111、pMA112、pMA113およびpMA115により発現された変異酵素を、種々のヘテロ2官能性カップリング試薬により抗 α -フェトプロテインモノクローナル抗体(抗AFP抗体)に結合させた。これらの抗体/酵素結合体を引き続きEIAにおいて指示試薬として用いた。たとえば、変異プラスミドpMA113からのアルカリホスファターゼを結合させた抗AFP抗体を用いたアッセイにおいてAFP標準曲線を作成した。このpMA113酵素/抗体指示試薬からは、同様のアッセイ条件下で哺乳動物酵素/抗体指示試薬を用いて得られた標準曲線に匹敵する標準曲線が作成された。ヘテロ2官能性カップリング試薬の使用は当業者にはよく知られており、特定のヘテロ2官能性カップリング試薬が本発明の指示試薬に必須であるということはない。

【0050】本発明の新規アルカリホスファターゼはまた、幾つかの他のタンパク質、たとえば癌抗原-125および抗-癌胎児性抗原抗体、癌抗原19-9Fab断片およびヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン抗体にも化学的にカップリングさせた。これらすべての場合において自動EIAに使用することに成功した。この場合、アルカリホスファターゼの存在は、酵素基質を添加して検出可能な生成物を生成させ、反応成分の存在または量を示すことにより検出することができる。アルカリホスファターゼ標識を利用する結合アッセイに使用するため、多くのアルカリホスファターゼ基質を利用することができる。一般に用いられる基質は、p-ニトロフェニルホスフェート(pNPP)、5-クロロ-4-プロモ-3-インドリルホスフェート(XP)、およびメチルウンベリフェリルホスフェート(MUP)などである。MUPおよびpNPP基質がイムノアッセイにおいてしばしば用いられる。結合アッセイの別態様として、指示試薬が酵素基質で標識した特異的結合成分からなり、アルカリホスファターゼ酵素を添加して検出可能なシグナルを生成させてもよい。

【0051】つぎに、実施例に基づいて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限られるものではない。

実施例1

変異および野生型phoA遺伝子の調製:

(a)オリゴヌクレオチドの合成: 本発明にとって必須ではないが、アルカリホスファターゼ遺伝子の突然変異誘

発および該遺伝子の発現を容易にするため、合成phoA遺伝子を構築した。合成遺伝子の構造は、チャングらのGene44、121~125(1986)(参照のため本明細書に引用する)に開示されている野生型の大腸菌アルカリホスファターゼ遺伝子の配列に基づいた。この遺伝子を、約50~100塩基対の間隔にて大腸菌コドン選択(preference)および独特制限部位で遺伝子操作した。phoA遺伝子を合成するため、マンデッキらのGene68、101~107(1988)(参照のため本明細書に引用する)に開示された遺伝子合成のFokI法を用いた。phoA遺伝子を、それぞれ長さが73塩基の21のオリゴヌクレオチドサブ配列に分割した。FokIアームに対応する付加30塩基を各サブ配列に付加し、開裂部位の各側で重複または切断プラスミドDNAにアニールするようにした。

【0052】オリゴヌクレオチドの合成は、5'-ジメトキシトリチルヌクレオシド β -シアノエチルホスホールアミダイトを用い、アプライドバイオシステム(Applied Biosystem)380B合成機(アプライドバイオシステムズ、フォスターシティ、CA)で行った。得られたオリゴヌクレオチドを、10%ポリアクリルアミドゲル(10%ポリアクリルアミド、7.0M尿素、および1×TBE[89mMトリス-ホウ酸塩、89mMホウ酸、2.0mMエチレンジアミン四酢酸(EDTA)])上のゲル電気泳動(Gene68、101~107、1988にも記載されている)により精製した。UV陰影(shadowing)によりDNAを視覚化し、103塩基対サブ配列に対応するバンドをゲルから切り出した。マキサムの溶離緩衝液(0.5M酢酸アンモニウムおよび1mMEDTA)(1ml)を用い、37℃にて16時間、切り出したゲル部分からオリゴヌクレオチドを溶離した。残留するポリアクリルアミドを除去するため、溶離したオリゴヌクレオチドをフィルター[0.2 μ Mセントレックス(Centrex)フィルター;シュライヒャー&シュエル(Schleicher & Schuell, Inc., キーン, NH)]に通した。精製したオリゴヌクレオチドを5容量のエタノールで沈殿させ、水(50 μ l)中に再懸濁し、ベックマンDU-7分光光度計[ベックマン・インスツルメンツ(Beckman Instruments)パロアルト, CA]を用いて定量した。合成オリゴヌクレオチドの配列を第1図~第3図に示す。

【0053】(b)DNAのクローニング: 上記架橋突然変異誘発プロトコールにより、合成オリゴヌクレオチドのプラスミドベクター中へのクローニングを行った。クローニング用に選択したプラスミドは、上記pWM500およびpWM501であった。

【0054】クローニングベクターをSmaI制限酵素で開裂した。開裂したプラスミド(約50ng)を変性緩衝液(10mMKCl、5mMトリス-HCl、pH8.0、5mMMgSO₄および0.5mMジチオトレイトール)(30 μ l)中でオリゴヌクレオチドサブ配列(20

ピコモル)と混合した。この試料を沸騰水浴中で100℃にて3分間加熱し、ついで室温に5分間冷却した。ついで、試料を冷却したコンピテントなJM83宿主細胞(100μl: ara, Δ[lac-proAB], strA, thi, Φ80d, lacZΔM15)と混合した[ビエイラ(Vieira)らのGene19, 259~268(1982)に記載のようにして](参照のため本明細書に引用する)。JM83細胞は、マンデル(Mandel)らのJ. Mol. Biol., 53, 159~162(1970)(参照のため本明細書に引用する)に開示のCaCl₂法により調製した。この混合物を氷上で5分間冷却し、ついで37℃で3分間熱ショックを与えた。約2mlのルリアブロス(LB)培地(11当たりバクトトリプトン10g; バクトー酵母エキス5g; およびNaCl10g; pH7.5を含有)を形質転換混合物に加え、混合物を37℃で1時間インキュベートした。ついで、形質転換した細胞をSorvall GLC-2B卓上遠心管中で遠心分離にかけた(4,000rpmで5分間)。細胞をLB培地(100μl)中に再懸濁し、アンピリシン耐性を有するコロニー(すなわち、プラスミドを含有する細胞)を選択するため、5-プロ

モ-4-クロロ-3-インドリル-D-ガラクトシド(1.6mg)およびアンピリシンを含有するLBプレート(LB培地/アンピリシン; 25mg/mlで100μl)上にプレーティングした。プレートを37℃で15時間インキュベートし、β-ガラクトシダーゼ発色アッセイにより形質転換体を数えた。

【0055】21のクローニングオリゴヌクレオチドのそれぞれについて、4つの個々の細胞コロニーを取り出した。アンピリシン(100μg/ml)を含有するLB培地(0.5ml)に単一コロニーを接種した。5時間間

に攪拌しながら37℃で培養液を増殖させた。ついで、21の個々の細胞培養液(すなわち、一つの培養液が各オリゴヌクレオチドサブ配列に対応する)をプールし、アンピリシンを含有するLB培地(11)に加え、600nmでの光学密度が0.65となるまで2.5時間増殖させた。オリゴヌクレオチドサブ配列の合成の間に生じたかもしれない別の変異を含むサブクローンを回避する目的で、プールしたサブ配列について4つの別々の培養液を調製した。培養液をクロラムフェニコール(最終濃度25mM)で増幅し、37℃で16時間インキュベートした[フレンケル(Frenkel)らのDNA, 5:539~544(1986)に開示のように](参照のため本明細書に引用する)。

【0056】(c)DNA断片挿入物の構築: 形質転換細胞を遠心分離(10,000×gで5分間、4℃)により回収した。細胞を溶解し、バーンボイム(Birnboim)らのNucleic Acids Research, 7:1513(1979)(参照のため本明細書に引用する)に開示のように、プラスミドDNAをセシウムクロライド勾配上で精製した。

【0057】4つのプール調製物の精製プラスミドDNAをFokIで消化してDNA断片挿入物を得た。約250μgのプールしたサブ配列プラスミドDNAを、37℃で2.5時間、500μlの緩衝液(20mM KCl, 10mM トリス-HCl, pH7.5, および10mM MgCl₂)中で200単位のFokIで消化した。消化物を6%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動にかけ、73塩基対オリゴヌクレオチドサブ配列に対応する断片を切り出した。上記実施例1(a)に記載したオリゴヌクレオチドの精製に用いた方法に実質的に従い、断片の溶離を行った。

【0058】精製FokI断片を水(15μl)中に再懸濁した。4つの試料のそれぞれのアリコート(0.5μl)を0.8%アガロースゲル上の電気泳動にかけて、生成したDNAの濃度をほぼ決定した。推定定量に基づき、各試料から4.5μgのプールFokI断片が得られた。

【0059】(d)変異大腸菌株: 高度に発現される機能性のアルカリホスファターゼタンパク質を製造するため、21の断片挿入物を合成プラスミドpWM518にライゲートした。この発現系では、合成phoA遺伝子は天然phoA遺伝子のラクトースプロモーターおよびリボソーム結合部位の制御下にあった。150ngのBamHI/HindIII開裂ベクターとライゲートするため50ngの各断片を用いた。

【0060】変異のないphoA遺伝子(pMA100と称する)を確実に得るため、4つのプラスミド調製物の等アリコートを合わせた。pMA100の制限地図は第4図に示してあり、合成野生型大腸菌アルカリホスファターゼ(独特制限部位を有する)のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を第5図~第6図に示す。オリゴヌクレオチドサブ配列とベクターとのライゲーションは、ライゲーション混合物(10μl: 60mM トリス[pH7.5]; 5mM MgCl₂; 0.4mM アデノシン三リン酸; および10mM ジチオトレイトール)中で行った。酵素リガーゼ(T4DNAリガーゼ)を添加する前に、試料を42℃で15分間インキュベートし、ついで4℃で1.5時間置いた。リガーゼ添加後、試料を0℃にて16時間インキュベートした。5%アクリルアミドゲル(1/50ビスアクリルアミド)上で分析することにより、ライゲーション反応の完了を試験した。ライゲート物質の移動から、pWM518中の完全長phoA遺伝子に対応する3.5キロベース断片、およびはしご状に付着した部分的にライゲートした断片および非ライゲート断片が明らかになった。ついで、ライゲート混合物をSCS-1宿主細胞(F⁻, recA1, gyrA96, thi, hsdR17, (r_k-m_k), supE44, relA1, λ⁻: ストラタジーン、サンジエゴ, CA)中に形質転換した。形質転換法は、ハナハン(Hanahan)のJ. Mol. Biol., 166, 557~580(1983)(参照のため本明細書に引用する)に記載された方法に従って行った。SCS

—1細胞(100 μ l)を融解し、前もって冷却しておいたポリプロピレンチューブ(15ml; ファルコン2059、フィッシャー・サイエンティフィック(Fisher Scientific)、ピッツバーグ、PA)中にアリコートした。 β -メルカプトエタノール(1.4M、1.7 μ l)を細胞に加え、0℃にて10分間穏やかに回転撹拌した。1ngのプラスミドDNAを細胞に添加して最高の形質転換効率(すなわち複製プラスミドを含有する宿主細胞数が最大)が得られた。混合物の種々の希釈(第2表に示す)を研究した。試料を氷上で30分間インキュベートした。その間、試料を、周期的に45℃の水浴中に45秒間熱処理したのち氷上に2分間置く方法をとった。SOC培地(0.9ml)を加え、試料をインキュベートした(225rpmで震盪させながら37℃で1時間)(SOC培地は、11当たり、バクトトリプトン20g、バクト酵母エキス5g、10mM NaCl、および2.5mMKClを含有し、2M濾過滅菌Mg溶液[1ml/100ml SOC; 1MMgCl₂および1MMgSO₄]および2M濾過滅菌グルコース溶液[1ml*

第2表(形質転換効率)

試料	ライゲーション混合物 (1.0 μ l)	DNA濃度 (ng)	コロニー数
試料1	希釈せず	120.0	3青、362白
試料2	1:10希釈	12.0	3青、124白
試料3	1:25希釈	4.8	0青、53白
試料4	1:50希釈	2.4	0青、16白
ライゲートした切断ベクター	希釈せず	15.0	68白
pUC9		1.0	~20,000白

【0063】わずかに6つの形質転換体(6つの青色コロニー)のみが機能性の合成phoA遺伝子の存在を示したにとどまったので、天然配列を分析するためのクローンをもっと得るために形質転換プロトコルを繰り返した。全部で16のコロニーを形質転換SCS-1細胞から取り出し、バーンボイムらのNucleic Acids Res. 7、1513(1979)(参照のため本明細書に引用する)に開示されたミニプレプ(miniprep)法によりプラスミドDNAを単離した。各試料のアリコートをEcoRIおよびHindIIIで消化し、分子量マーカー(DNA/HindIII断片、 Φ X174RF DNA/HindIII断片および1キロベースDNA; ベセスダ・リサーチ・ラボラトリーズ、ガイセルスバーグ、MD)とともに0.8%アガロースゲル上で電気泳動にかけた。消化した16の試料のうち、すべての試料が、1.4キロベース(全長アルカリホスファターゼ遺伝子の対応する長さ)の断片挿入物を含有していた。

【0064】16の試料から4つのクローンを取り出し、プラスミドDNAをそれぞれ単離し、CsCl勾配上で精製した[ラドロフ(Radloff)らのProc. Natl. Acad. Sci. 57、1514~1521(1967)(参照のため本明細書に引用する)に開示のようにして]。複数の

*100ml SOC]と混合したものであった)。インキュベーション後、細胞を1000rpmで10分間遠心分離にかけて濃縮した。得られたペレットをSOC(200 μ l)中に再懸濁し、アンピシリン(50 μ g/ml)を含有するLB培地上にプレーティングした。

【0061】アルカリホスファターゼを合成したコロニーは、水中に懸濁したBCIP(100 μ l; 20mg/ml)を各プレートに加えて生じた青色の呈色により同定した。形質転換効率を第2表にまとめて示す。形質転換効率の比較定量決定のため、SCS-1細胞をpUC9プラスミドDNA(通常、コントロールとして用いられる; ベセスダ・リサーチ・ラボラトリーズ、ガイセルスバーグ、MD)でも形質転換した。SCS-1宿主細胞の全形質転換効率は、約 2×10^7 コロニー/ μ g pUC9 DNAであった。ストラタジーンにより記載された効率は、 1×10^9 コロニー/ μ g DNA以上である。

【0062】

重複配列プライマーを用いるサンガー(Sanger)のジデオキシ法[サンガーら、Proc. Natl. Acad. Sci. 74、5463~5467(1977)(参照のため本明細書に引用する)]により試料のシーケンシングを行った。4つのすべての試料が同じ変異(1191位におけるC→T、1220位におけるT→Cおよび1333位におけるA→G)を有していた。第一の変異はサイレントであったが、残りの変化はVal³⁷⁷>AlaおよびSer⁴¹⁵>Glyの変異となった。得られたクローンをpMA110と称した。

【0065】(e)合成野生型大腸菌株の調製: 野生型phoA遺伝子(pMA100)を基礎として用い、その後の比活性の向上したアルカリホスファターゼをコードするDNA修飾を調製した。加えて、合成野生型生物からのアルカリホスファターゼも、市販の大腸菌アルカリホスファターゼとの比較と同様、変異酵素を評価するのに有用であった。合成野生型phoA遺伝子を調製するため、pMA110プラスミド中に存在する遺伝的変異を修復する必要があった。実質的に実施例1(a)に記載のプロトコルに従って調製した合成オリゴヌクレオチドを用い、変異配列を野生型配列で置換した。変異の位置に基づいて、246塩基対に対応するBglII/SphI断片

を置換する必要があった。

【0066】pMA110プラスミド(約10 μ g)を1 \times 増地塩緩衝液(100 μ l; 100mM NaCl、50mM トリス-HCl、pH7.5および10mM MgCl₂)中、37 $^{\circ}$ Cにて16時間、Bgl I I(75単位)で消化した。消化が完了したことを試験するため、アリコート0.8%アガロースゲル上の電気泳動にかけた。塩濃度を150mM NaClに増加させ、上記DNAを37 $^{\circ}$ Cで16時間、Sph I(60単位)でさらに消化した。得られた3.2キロベースのプラスミド断片を5%ポリアクリルアミドゲル(1/50ビス-アクリルアミド)上で精製し、実質的に実施例1(a)に記載の方法に従ってDNAを抽出した。

【0067】切り出した変異Bgl I I/Sph I断片を、Bgl I I/Sph I断片(247塩基対からなる)の天然配列に対応する3つの合成オリゴヌクレオチド(それぞれ、約80塩基の長さ)で置換した。T4DNAキナーゼ(3.0単位; ベセスダ・リサーチ・ラボラトリーズ、ガイセルスバーグ、MD)を用い、約4ピコモルの各合成オリゴヌクレオチドを1 \times ライゲーション緩衝液(15 μ l; 60mM トリス-HCl、pH7.5、5mM MgCl₂、0.4mM ATP)中、37 $^{\circ}$ Cで30分間キナーゼ処理した[リチャードソン(Richardson)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. 2、815(1971)(参照のため本明細書に引用する)]。70 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートし4 $^{\circ}$ Cで1.5時間かけてゆっくりと冷却することにより、相補的オリゴヌクレオチドをアニールした。ついで、アニールした合成オリゴヌクレオチドを3.2キロベースの精製合成プラスミドにライゲートした。ライゲーション、形質転換およびインキュベーションは実質的に上記方法に従ったが、得られた合成プラスミドはM Z 13b宿主細胞中にクローニングした。

【0068】約200の青色コロニーと120の白色コロニーが得られた。4つの青色コロニーを選び、実質的に上記方法に従ってミニプレブDNAを調製した。置換または修復したオリゴヌクレオチドに対応する領域を実質的に上記方法に従ってサンガーのジデオキシ法によりシーケンシングした。シーケンシングしたクローンはすべて野生型のphoA配列を有していた。天然および変異アルカリホスファターゼから得られたコロニーの色強度を比較すると、変異コロニーは天然コロニーに比べると濃い青色であった。

【0069】実施例2

変異株のスクリーニングのための天然phoAの修飾発現：天然のアルカリホスファターゼにより示される強い色のため、比活性の増大したアルカリホスファターゼ変異株を高感度でカラースクリーニングすることは困難であった。天然のアルカリホスファターゼから変異株を識別するため、天然phoAの発現を減少させる必要があった(すなわち、薄い青色の天然コロニーを得る必要があ

った)。アルカリホスファターゼの発現レベルを減少させることは、phoAのシャイン-ダルガルノ配列(GGA GA)を縮重配列で置換し、BCIP基質を用いて青色の微弱なコロニーを選択することにより行った。

【0070】天然リボソーム結合部位を除去するため、pMA100(15 μ g、実施例1(e)から)を1 \times 増地塩緩衝液中、37 $^{\circ}$ Cで16時間、BamH I(75単位)で消化した。塩濃度を150mM NaClに増加させ、このDNAを37 $^{\circ}$ Cで16時間、Sal I(75単位)でさらに消化した。リボソーム結合部位は、実施例1に記載したように、適当な位置に縮重配列を含むオリゴヌクレオチドを用いることにより架橋突然変異誘発により置換された。種々のレベルのアルカリホスファターゼ比活性を発現する約1,000のクローンが得られた。

【0071】非常に薄い青色から中位の青色までの3つのコロニーを単離し、実質的に実施例1に記載のプロトコールに従ってプラスミドDNAを調製した。各試料で得られた変異リボソーム結合部位の構造を決定するため、実質的に実施例1に記載のプロトコールに従ってサンガーのジデオキシシーケンシング法を再び用いた。このシーケンシングの結果は、シーケンシングした形質転換体は(1)リボソーム結合部位が完全に欠失しているか、または(2)配列ATGGCまたはCAATAを含むリボソーム結合部位を有しているか、いずれかであることを示していた。ATGGCリボソーム結合部位に対応する試料は最も薄い青色を示し、pMA101と称した。ついで、比活性を増大させるためさらにphoA遺伝子の突然変異誘発を行い、リボソーム結合部位の変異した天然phoAを含むpMA101合成プラスミドを用いてアッセイした。

【0072】実施例3

天然アルカリホスファターゼの突然変異誘発：アルカリホスファターゼの比活性を増大させるため、酵素の活性部位、または触媒残基Ser¹⁰²から約10Å~約20Å以内の領域に突然変異誘発を引き起こした。突然変異誘発の目的とするアミノ酸は、Val⁹⁹、Thr¹⁰⁰、Asp¹⁰¹、Ala¹⁰³、Thr¹⁰⁷およびLys³²⁸であった。アミノ酸Val⁹⁹、Thr¹⁰⁰、Asp¹⁰¹、Ala¹⁰³およびThr¹⁰⁷は触媒残基のSer¹⁰²に近いと、とりわけ突然変異誘発の最重要目的であった。Lys³²⁸も目的とされ、これは正に荷電していて、酵素の活性部位の直ぐ近傍にある。

【0073】Val⁹⁹、Thr¹⁰⁰およびAsp¹⁰¹アミノ酸の突然変異誘発は、pMA101のSnaB I制限部位における架橋突然変異誘発により行い、Lys³²⁸の突然変異誘発はCla I制限部位において行った。Ala¹⁰³およびThr¹⁰⁷については、pMA101プラスミドをSnaB IおよびEcoR Vで消化した後に架橋突然変異誘発を行った。合成オリゴヌクレオチドは実施例1に記載のようにして調製したが、各合成オリゴヌクレオチ

ドは変異させようとするアミノ酸の縮重配列を含んでいた。

【0074】架橋突然変異誘発の標準法を5倍増大させたスケールで行い、変異させた各残基に対してすべての可能なアミノ酸置換を含むクローンのライブラリーを得た。pMA101ベクター(250ng、実施例2から)をSnaBIか(99位、100位および101位の変異のため)、ClaIか(328位の変異のため)、またはSnaBIおよびEcoRV(103位および107位の変異のため)で完全に消化した。消化したベクターおよび合成オリゴヌクレオチド(100ピコモル)を混合し、100℃で3分間加熱した。試料を5分間冷却し、コンピテン

10

トなJM83細胞(500μl)に加えた。形質転換混合物を氷上で5分間インキュベートし、ついで37℃で3分間熱ショックを与えた。LB培地(2.0ml)を各試料に加え、試料を37℃で60分間インキュベートした。細胞を遠心分離によりペレット化し、LB培地(1*

*00μl)中に再懸濁し、LBプレート(100μg/mlのアンピシリンおよび1.0μg/mlのBCIPを含有)上に広げた。プレートを37℃にて16時間インキュベートした。リボソーム結合部位の変異によりphoA発現が減少しているため、プレートを室温にてさらに6時間インキュベートした。バックグラウンドと比較して青色の濃いコロニーを、比活性の増大したphoA変異株と評価した。

【0075】青色のコロニーを選択し、ミニプレブDNAを実質的に実施例1に記載した方法に従ってサンガーのジデオキシシーケンシングのために調製した。変異の結果を第3表に示す。天然アルカリホスファターゼと比較して変異株の比活性に関する一層正確なデータを得るため、各試料から精製タンパク質を得ることも必要であった。

【0076】

第3表(突然変異誘発結果)

変異させたアミノ酸	コロニー数	コドン
pMA114	260濃青色	GCA;GCT
Val ⁹⁹ >Ala	380薄青色	
	3680白色	
pMA111および112	23濃青色	GTA/ATC
Thr ¹⁰⁰ >Val	316薄青色	
Thr ¹⁰⁰ >Ile	76白色	
pMA115	130濃青色	TCA;TCC
Asp ¹⁰¹ >Ser	260薄青色	
	4200白色	
pMA113	11濃青色	CGA;AGA;
Lys ³²⁸ >Arg	320薄青色	CGT
	16白色	
pMA116	270濃青色	GCT
Lys ³²⁸ >Arg	490薄青色	
Val ⁹⁹ >Ala	1340白色	
pMA117および118	23濃青色	GAT;TGT
Ala ¹⁰³ >Asp	141薄青色	
Ala ¹⁰³ >Cys	180白色	
pMA119	15濃青色	GTG
Thr ¹⁰⁷ >Val	87薄青色	
	166白色	

【0077】第3表は、増大した比活性を有する変異アルカリホスファターゼ酵素が得られたアミノ酸変異の形質転換効率を示す。濃青色のコロニーは比活性の増大したアルカリホスファターゼ変異体を示し、薄青色のコロニーは天然アルカリホスファターゼに匹敵する比活性を有する変異体であり、白色のコロニーは比活性の減少した変異体であった。pMA113(Lys³²⁸>Arg)が高い比活性を有していたので、引き続き突然変異誘発

に用いた。たとえば、pMA116は、pMA113プラスミドにおいてさらにVal⁹⁹をAlaに変えることにより調製した。各アミノ酸置換について得られたコドンを、サンガーのジデオキシシーケンシング法により決定した。

【0078】実施例4

アルカリホスファターゼの精製：天然および変異アルカリホスファターゼの酵素速度論を決定するため、充分な

量の酵素を得なければならなかった。各試料について21シェーカーフラスコ発酵法を行った。スターター培養液は、20mMグルコースを含有するLB培地/アンピシリン(40ml)中での単一コロニーの一夜培養液であった。グルコースを添加すると生物のアルカリホスファターゼ発現が抑制された[アルカリホスファターゼの発現は本発明の発現系ではlacプロモーターにより制御されている[マガサニク(Magasanik B)、ザ・ラクトース・オペロン(The Lactose Operon)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、コールドスプリングハーバー、NY、189~219、1970]]。激しく震盪しながら、培養液をフラスコ(250ml)中、37℃で一夜増殖させた。培養液を10分間遠心分離(4,000×g)にかけ、上澄み液を捨て、ペレットをLB培地/アンピシリン(40ml)中に再懸濁した。LB培地/アンピシリン(21)を入れた61容フラスコに上記一夜培養液を接種し、激しく震盪しながら37℃で約6時間インキュベートした。

【0079】アルカリホスファターゼの精製を下記方法で行った。600nmで1.3~1.4の光学密度に達してから、形質転換細胞を遠心分離(4800rpmで20分間、4℃)により回収した。アルカリホスファターゼを抽出するため、21の培養ブロスからの細胞を冷0.15Mトリス-HCl緩衝液、pH6.8(80ml; 0.9%NaClおよび6mg/mlのポリミキシンB含有)中に懸濁した[エバンス(Evans)ら、the Journal of Infectious Diseases、133、S97~S102(1976)(参照のため本明細書に引用する)]。37℃の水浴中で7~10分間インキュベートした後、細胞を遠心分離(8,000×gで5分間、4℃)により除去した。

【0080】上記ポリミキシンB抽出物に4℃にて固体の硫酸アンモニウムをゆっくりと加えて85%飽和にもっていき、ついで4℃で24時間ゆっくりと攪拌した。得られた沈殿を遠心分離(8,000×gで5分間、4℃)により回収し、0.02Mトリス-HCl緩衝液(pH8.0、1mM MgCl₂含有)中に再懸濁した。この試料の透析を0.02Mトリス-HCl緩衝液(pH8.0、1mM MgCl₂含有)(8~121)に対して4℃で行った。ついで、限外濾過セル(アミコン、モデル8050、デンバー、MA)を用いて試料を5~10倍に濃縮した。

【0081】モノP HR5/5カラムおよびポリバッファー74および96(シグマ・ケミカル・カンパニー、セントルイス、MO)を用い迅速タンパク液体クロマトグラフィシステム(ファルマシア、ピスカウエイ、NJ)上でアルカリホスファターゼのクロモフォーカスクロマトグラフィーを行った。カラムを0.025Mピス-CH₃COOH(pH6.9、1mM MgCl₂含有)で平衡化した。ポリバッファー-CH₃COOH溶液

(pH5.5; 6%[v/v]ポリバッファー96、6%[v/v]ポリバッファー74および1mM MgCl₂含有)でタンパク質を溶離した。これらの条件によりpH6.5~5.5の直線pH勾配が得られ、活性タンパク質はpH6.3~6.1で溶離した。20mMトリス(pH8.0、1mM MgCl₂含有)中で平衡化したセファデックスG-75上でのゲル濾過クロマトグラフィーにより、ポリバッファーを試料から除去した。得られた酵素試料を、アミコンセントリコン-30マイクロコンセントレーターを用いて3~6倍に濃縮した。

【0082】実施例5

精製アルカリホスファターゼの分析：精製タンパク質の特徴付けには、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動[ラムリ(Laemmli, U. K.), Nature、277、680(1970)(参照のため本明細書に引用する)]が含まれていた。電気泳動により単一の主要なバンドが示され、これは全体の染色タンパク質の98%以上を占めるものであり、46,000ダルトン(アルカリホスファターゼのモノマーに予測されるサイズ)の分子量に対応した。これらの条件下での各遺伝子操作したアルカリホスファターゼの電気泳動移動度は、市販の大腸菌アルカリホスファターゼ(シグマ)のものと同一であった。

【0083】得られた変異酵素の速度定数(V_{max} および K_m)の測定を、酵素基質pNPP(シグマ)および4-メチルウンベリフェリルホスフェート(4-MUP; ベーリンガー・マンハイム、インディアナポリス、IN)を用い、1Mトリス-HCl緩衝液(pH8.0、1mM MgCl₂含有)中、25℃で行った。ヒューレット-パッカード(Hewlett-Packard)9153AUV分光光度計を用い、410nm($\epsilon=1.62 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)での吸光度の変化を追跡することによりpNPP基質のp-ニトロフェノールへの変換をモニターした。4-MUP基質からのメチルウンベリフェロンの放出を蛍光計でモニターした($\lambda_{exc}=340 \text{ nm}$; $\lambda_{emit}=465 \text{ nm}$; $\epsilon=5.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。初期速度は、最初の5~10%の反応($r>0.997$)からグラフで決定した。6~8点のラインワイパー-パークプロットから k_{cat} および K_m 値を得た。

【0084】各酵素から得られた結果を第4表にまとめて示す。基質としてpNPPおよびMUPを用い、すべての変異酵素は天然のアルカリホスファターゼよりも高い比活性を有していた。pNPPを用いた決定では、酵素比活性の増加は1.6~3.9倍上昇の範囲であった。 K_m 値は変異プラスミドpMA113により産生された酵素で最も劇的に上昇したが、残りの酵素については相対的に変化がないかまたはわずかに上昇したに止まった。それゆえ、これら変異株は、 K_m において有益な変化が認められないにしても、増大した比活性を有し、許容し得るものである。

【0085】

第4表(変異酵素の速度定数)

アルカリホスファターゼ	dNPP基質		4-MUP基質	
	V_{max} (μ モル	K_m	V_{max} (μ モル	K_m
	$mg^{-1}分^{-1})$	(μM)	$mg^{-1}分^{-1})$	(μM)
pMA100 野生型	56	30.1	106	9.3
pMA110 Val ³⁷⁷ >Ala Ser ⁴¹⁵ >Gly	90	23	182	14.4
pMA111 Thr ¹⁰⁰ >Val	123	19.8	190	10.1
pMA112 Thr ¹⁰⁰ >Ile	133	20.2	229	10.2
pMA113 Lys ³²⁸ >Arg	220	94.4	217	47.7

【0086】酵素の熱安定性を下記方法で測定した。各アルカリホスファターゼの可逆的熱不活化の経時変化の測定を、酵素溶液(20 $\mu g/ml$ 、加熱温度の0.02 M トリス-HCl、pH 7.5 中で調製、1 mM MgCl₂ を含有)を定温加熱ブロック中でインキュベートし、試料を定期的に取り出して25℃でアッセイすることにより行った。一次速度定数および可逆的熱不活化の*

*半減期を半対数方眼中での直線回帰により測定し、すべての細胞で少なくとも0.97の相関係数が得られた。85℃およびpH 7.5での幾つかのアルカリホスファターゼの可逆的熱不活化の経時変化の例を第5表に示す。

【0087】

第5表(可逆的熱不活化の経時変化)

時間(分)	残留活性(%)		
	pMA100	pMA111	pMA112
0	100	100	100
3	102	91	78
6	102	82	60
9	96	76	53
12	97	69	44
15	96	63	39

【0088】各変異酵素の同様の研究結果を第6表に示す。変異酵素はすべて、天然のアルカリホスファターゼに比べて速い速度で可逆的熱不活化を引き起こした。しかしながら、変異酵素の熱安定性は、ウシ腸管アルカリ

ホスファターゼ(同様のアッセイ条件下で70℃のみ6分間の半減期を有する)の熱安定性よりも優れていた。

【0089】

第6表(変異酵素の熱安定性)

アルカリホスファターゼ	温度(℃)	速度(分 ⁻¹)	半減期(分)
pMA100 野生型	95	0.126	5.5
pMA110 Val ³⁷⁷ >Ala Ser ⁴¹⁵ >Gly	80	0.100	6.9
pMA111 Thr ¹⁰⁰ >Val	85	0.031	22.6
pMA112 Thr ¹⁰⁰ >Ile	85	0.062	11.1
pMA113	85	0.064	10.8

31			
	Lys ³²⁸ >Arg		
pMA114	80	0.040	17.3
	Val ⁹⁹ >Ala		
pMA115	80	0.051	13.6
	Asp ¹⁰¹ >Ser		
pMA116	75	0.138	5.0
	Lys ³²⁸ >Arg		
	Val ⁹⁹ >Ala		

32

【0090】実施例6

アルカリホスファターゼの速度定数に及ぼすpHの影響：変異酵素pMA115(Asp¹⁰¹>Ser)およびウシ腸管アルカリホスファターゼ(ペーリンガー・マンハイム、インディアナポリス、IN)の両方について、速度定数(K_aおよびV_{max})に及ぼすpHの影響を測定した。測定は4-MUPを基質として用い、25℃で行った。ヒューレット・パッカード9153A UV分光光度計を用い360nmでの吸光度の増加(吸光係数はメチルウンベリフェロンを用いて実験的に決定し、第7表に示した)を追跡することにより、基質からのメチルウンベリフェロンの放出をモニターした。50mMトリス*20

(pH8~9.5)または50mMジチオエタノールアミン(シグマ)(pH9~11)およびNaCl(シグマ)を含む低イオン強度緩衝液(I=200)を用いた。V_{max}およびK_a値は、6~7点のラインウイパーパークプロットから得た。V_{max}からk_{cat}への変換は、ウシ腸管アルカリホスファターゼについては150,000ダルトンの分子量、pMA115アルカリホスファターゼについては94,000ダルトンの分子量をそれぞれ用い、両酵素についてダイマー当たり2つの活性部位を用いて行った。その結果を第7表に示す。

【0091】第7表(基質として4-MUPを用いたアルカリホスファターゼの速度定数に及ぼすpHの影響)

pH	吸光係数 (M ⁻¹ cm ⁻¹)	pMA115			ウシ腸管		
		K _a (μM)	V _{max} (μM/分)	k _{cat} (秒 ⁻¹)	K _a (μM)	V _{max} (μM/分)	k _{cat} (秒 ⁻¹)
8.0	1.09×10 ⁴	3.1	11.4	30	7.9	48.4	303
8.5	1.4×10 ⁴	6.7	26.5	69	18.2	58.7	367
9.0	1.62×10 ⁴	50.3	66.2	173	43.9	91.9	574
9.5	1.65×10 ⁴	410	176	459	111	140	875
10.0	1.67×10 ⁴	1660	262	684	348	181	1130
10.5	1.68×10 ⁴	3520	284	741	4762	632	3950
11.0	1.69×10 ⁴	3630	239	623	16600	1116	3980

【0092】両方の酵素においてK_a値およびk_{cat}値は、調べたpH範囲のほぼ全pH範囲でpHとともに増加した。変異大腸菌アルカリホスファターゼとウシ腸管アルカリホスファターゼの間でk_{cat}の差異が最も小さいのは、pH10.0の場合である。このpHではウシ腸管酵素は変異大腸菌酵素よりもわずかに1.65倍速いにすぎない。pH10.0でK_a値が増大しても、本発明の新規酵素はアッセイの標識として使用するのに適している。pNPP基質を用いて同様の実験を本発明の酵

素および天然大腸菌アルカリホスファターゼ(pMA100)について行った。pNPP基質のp-ニトロフェノールへの変換を、ヒューレット・パッカード9153A UV分光光度計を用い410nmでの吸光度の変化(ε=1.62×10⁴M⁻¹cm⁻¹)を追跡することによりモニターした。これら酵素のk_{cat}値に及ぼすpHの影響を第8表に示す。本発明の酵素pMA115のk_{cat}値は、pH10.0において野生型大腸菌アルカリホスファターゼに比べておよそ36倍高かった。

【0093】第8表(基質としてpNPPを用いたアルカリホスファターゼのk_{cat}値に及ぼすpHの影響)

pH	pMA100		pMA115		ウシ腸管
	K _a	k _{cat}	K _a	k _{cat}	
8.0	8	35	35	345	345
8.5	10	78	78	480	480
9.0	12	154	154	760	760
9.5	13	255	255	1004	1004
10.0	30	1068	1068	2113	2113
10.5	33	947	947	4675	4675
11.0	28	927	927	7175	7175

【0094】pNPPにおいて観察された傾向は、4-MUPで得られたものと類似していた。すなわち、 k_{cat} 値はpH8から10につれて上昇し、pMA115とウシ腸管アルカリホスファターゼとの間の k_{cat} 値の差異が最小となるのはpH10.0においてであった(2倍の差異がある)。 k_{cat} 値は天然大腸菌(pMA100)とウシ腸管アルカリホスファターゼとの間で全pH範囲にわたって大きな差異が存在し、pH10.0においても k_{cat} 値は70倍の差異があった。pMA115はウシ腸管酵素に比べてpH10.0での k_{cat} の差異が70倍からわずかに2倍に減少するので、野生型大腸菌アルカリホスファターゼよりも優れている。

【0095】実施例7

α -フェトプロテインのサンドイッチEIAにおける変異アルカリホスファターゼの使用：下記のように、まず変異酵素(pMA113からのアルカリホスファターゼ、実施例3に記載のようにして調製)およびモノクローナル抗AFP抗体を別に処理することにより、酵素標識抗AFP抗体を調製した。N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)中の50倍モル過剰のm-マレイミドベン

ゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SMCC)を、1Mリン酸緩衝液(pH7.2、1mM $MgCl_2$ 含有；最終DMF濃度5%)中のアルカリホスファターゼの0.6mg/ml溶液に加えた。25℃で3時間反応を行い、その後、SMCC処理酵素を4℃で18時間、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.2、1.0mM $MgCl_2$ 含有)に対して透析した。

【0096】0.1Mリン酸塩(pH7.2、1.0M $MgCl_2$ 含有)中の5.8mg/ml抗AFP抗体溶液を500倍モル過剰の2-イミノチオランで25℃にて1

時間処理した。ついで、このチオール化した試料を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.2、1mM $MgCl_2$ 含有)に対して4℃で18時間透析した。

【0097】上記SMCC処理酵素を上記チオール化抗AFP酵素に2:1のモル比および1mg/ml全タンパク質濃度にて加えた。4℃にて4時間反応させた後、N-エチルマレイミド(最終濃度0.3mM)を4℃にて30分間加え、ついで2-メルカプトエタノール(最終濃度1.0mM)を4℃にて30分間加えることにより反応を停止させた。ついで、この溶液を20mMトリス-HCl緩衝液(pH8.0、1.0mM $MgCl_2$ 含有)に対して4℃にて18時間透析した。

【0098】アボットIMx-AFPアッセイプロトコールおよび試薬(アボット・ラボラトリーズ、アボットパーク、IL)を用い、上記酵素/抗体指示試薬の性能を評価した。大腸菌変異株アルカリホスファターゼ指示試薬の基質は、1.5Mトリス-HCl緩衝液(pH8.0、1mM $MgCl_2$ 含有)中の1.2mMの4-MUPを含んでいた。上記アッセイキットからの指示試薬希釈緩衝液で酵素/抗体指示試薬を最終濃度1.3μg

/mlに希釈し、ついで濾過した(0.2μM膜)。この指示試薬を用いて第7図に示す標準曲線を作成した。第7図にはまた、ウシ腸管アルカリホスファターゼ標識抗AFP抗体指示試薬を用いて得た標準曲線も示してある。これら曲線間の相関から、哺乳動物酵素/抗体指示試薬が約0.8μg/mlで用いられるのと比較して、変異酵素/抗体指示試薬はアッセイにおいて1.3μg/mlもの低い濃度で用いることができることが示された。

10 【0099】実施例8

癌抗原のサンドイッチEIAにおける変異アルカリホスファターゼの使用：下記手順に従い、抗-癌抗原抗体断片を変異アルカリホスファターゼで標識した。pMA115からの変異アルカリホスファターゼの溶液(0.6μg/ml、0.1Mリン酸緩衝液、pH7.2中、1.0mM $MgCl_2$ 含有)を、穏やかに回転しながら450倍モル過剰の2-イミノチオランで25℃にて30分間処理した。このチオール化した試料を、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0、0.1M NaCl、1.0mM $MgCl_2$ および0.1mM $ZnCl_2$ 含有)で平衡化したセファデックスG-25カラム(1×45cm)上で脱塩し、同緩衝液で溶離した。

【0100】抗体断片を、穏やかに回転しながら、50倍モル過剰のスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル-1-トリカプラミド)シクロヘキサカルボキシレート(30原子リンカー)(DMF(最終濃度15%)中で調製)と25℃で30分間反応させた。ついで、この試料を、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0、0.1M NaClおよび5mM EDTA含有)で平衡化したセファデックスG-25カラム(1×45cm)上で脱塩し、同緩衝液で溶離した。

【0101】上記チオール化変異アルカリホスファターゼを上記活性化抗体断片と1.5:1のモル比で混合した。この反応混合物を2~8℃で15時間穏やかに回転し、N-エチルマレイミド(最終濃度0.1mM)を加えて反応を停止させた。25℃で1時間後、試料をトリス-HCl緩衝液(20mM、pH8.0、1.0mM $MgCl_2$ 含有)に対して4℃にて18時間透析した。

【0102】実質的に実施例7に記載の方法に従い、得られた酵素/抗体断片指示試薬を指示試薬緩衝液で最終濃度3.7μg/mlに希釈し、濾過した。実質的に実施例7に記載の方法に従い、この指示試薬をサンドイッチアッセイに用いて癌抗原を検出し第8図に示す標準曲線を作成した。第8図にはまた、同様にして調製したウシ腸管アルカリホスファターゼ/抗体断片指示試薬をアッセイ濃度1.64μg/mlで用いて得られた標準曲線も示してある。指示試薬濃度の差異を考慮した上で、変異酵素/抗体断片指示試薬の性能は哺乳動物酵素/抗体断片指示試薬に匹敵するものである。このアッセイの結果は、EIAにおける標識として変異酵素を用いた指

示試薬を首尾よく用いることができることを示していた。

【0103】実施例9

変異アルカリホスファターゼ/結合成分指示試薬の安定性：下記例外を除いて、実質的に実施例7に記載の方法に従って酵素標識抗AFP抗体を調製した。(1)pMA 110からの変異アルカリホスファターゼの0.6μg/ml溶液(0.1Mリン酸緩衝液中)を、DMF中に溶解した50倍モル過剰の30-原子リンカー(DMFの最終濃度15%)で25℃にて2時間処理し、(2)活性

化酵素とチオール化抗体(実質的に実施例7に記載の方法に従って調製)とを1:1のモル比で4℃にて8時間反応させた。得られた指示試薬を指示試薬希釈緩衝液で15μg/mlに希釈し(実施例6に記載のようにして)、45℃で熱的に刺激した。

【0104】指示試薬の熱不活化の経時変化を追跡するため、試料を60日間加熱条件下におき、実施例6に記載のプロトコールに従って指示試薬の性能を測定した。このアッセイの結果を第9図に示す。第9図にはまた、ウシ腸管アルカリホスファターゼ/抗AFP抗体指示試薬の熱不活化の経時変化をも示す。大腸菌変異アルカリホスファターゼを含む指示試薬は45℃で60日後に最初のシグナルの30%未満が失われたが、一方、哺乳動物酵素/抗体指示試薬では45℃でわずかに20日後に最初のシグナルの60%以上が失われた。大腸菌変異酵素/抗体指示試薬の熱安定性は、哺乳動物酵素指示試薬よりもはるかに優れていた。

【0105】実施例10

変異アルカリホスファターゼと特異的結合成分の部位特異的結合：この実験には、高い比活性を示しモノマー当たり1つの表面システイン残基を有する変異大腸菌アルカリホスファターゼを調製することが含まれていた。この反応性システイン残基の存在により、ヘテロ2官能性架橋試薬を用いて変異酵素を特異的結合成分に部位特異的に共有結合することが可能になった。この結合反応は、実施例7および8に記載してあるような2-イミノチオランを用いた非特異的的化学修飾によりチオール基を酵素に導入する必要をなくした。得られた特異的結合成分/酵素結合体は安定性が高く、EIAで非特異的結合が起こることが少ない。

【0106】実質的に実施例3に記載の方法に従って酵素を調製し、酵素の活性部位およびモノマー界面のいずれをも妨害しない位置に実質的に実施例3に記載した方法に従ってシステイン残基を酵素分子中に導入した。ついで、この修飾酵素を、実質的に実施例7および8に記載の方法に従い、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルまたは4-(マレイミドメチル-1-トリカルバミドシクロヘキサカルボキシレート)などのヘテロ2官能性架橋剤により特異的結合成分に結合させた。

【0107】実施例11

独特の制限部位を有する合成大腸菌プラスミドの構築：

(a)総論

合成大腸菌プラスミドを設計し、構築し、機能性のクローニングベクターであることが示された。遺伝子合成のFokI法(マンデッキおよびボリング, Gene, 68, 101; 1988)を用いて30オリゴヌクレオチドからプラスミドを組み立てた。このプラスミドは、β-ラクタマーゼ遺伝子の合成モジュール(modules)、複製開始点、lacZ遺伝子断片およびマルチクローニング部位を含んでおり、pUCタイプのプラスミドにならってパターン化される。違いは、pUCプラスミドに存在する制限部位のほぼ50%が除かれてあること、プラスミドのサイズが2050塩基対に小さくなっていること、およびβ-ラクタマーゼ遺伝子およびlacZ断片の両方の下流に転写ターミネーターを導入してあることなどである。これらの変化により、クローニング、突然変異誘発、発現および制限分析などの多くの方法が容易になる。

【0108】(b)プラスミドの設計：大腸菌の合成プラスミドの全設計は、クローニング/発現ベクターに必要なまたは望ましい特性に基づいた。1つの条件は、ベクターから得られた制限断片の操作および精製を容易にするため低分子量であることであった。他の望ましい特性は、重要な位置には独特の制限部位を導入しながら、可能な限り多くの制限部位を排除することであった。過去の経験では、多くの種々の制限部位を有するベクター中にクローニングする場合に、その後のDNA断片のサブクローニングには明らかな欠点を伴うことが示されている。

【0109】合成プラスミドを3つの別のカセットに分けた。第一に、pUC9(ピエラおよびメッシング, Gene, 19, 259~268; 1982)からの複製開始点を合成プラスミド中のori領域を構成するDNA配列として選択した。この配列には、RNAIおよびRNAIIの両方の複製プライマー領域、およびそれぞれのプロモーターが含まれている(ポリスキー、Maximizing Gene Expression、レズニコフ編、バタワース、ボストン、1986)。

【0110】第二に、pUCプラスミドのβ-ラクタマーゼ遺伝子を選択マーカーとして選んだ。この遺伝子は、pUC9中に認められる天然P3プロモーター[ブロシウス(Brosius)ら、J. Biol. Chem., 257, 9205~9210, 1982]および強力なファージfd遺伝子V1I1転写ターミネーター[ベック(Beck)ら、Nucleic Acids Res. 5, 4494~4510, 1978]を含んでいた。ori領域とは対照的に、幾つかの制限部位を除去することによりβ-ラクタマーゼのヌクレオチド配列を変えた。たいいていの場合(Ile⁸²>Val1およびVal¹⁸²>Alaの場合を除いて)、アミノ酸

配列は同じである。bla遺伝子中に天然に存在する制限部位の約60%を除去した。

【0111】第三に、pUCの α -相補的(complementing) lacZ 遺伝子断片もまた、ori領域およびアンピシリン耐性遺伝子を有することに加えて、クローニングマーカーとしての有用性および不均質融合タンパク質として発現されることのために望ましかった。pUC9からの lacZ 配列は、 β -ラクタマーゼ遺伝子における変化と同様にして制限部位の数を減少させた。SmaI 部位は、他のあらゆる所望の部位の挿入のため独特の制限部位として保持した。

【0112】(c) 遺伝子構築：遺伝子合成のFokI法を用いてpWM510を構築するため全部で25のオリゴヌクレオチドを合成し、これらオリゴヌクレオチドを上記のようにしてpWM500群のプラスミド中にクローニングした(マンデッキおよびボリング、Gene 68、101~107、1988)。プラスミドを精製し、FokIで切断して個々の断片に切り出す前に配列を確かめた。25のすべての断片(40塩基対~82塩基対)が独特の相補的な4つの塩基対突出を含んでおり、これら突出はアニールしライゲートしたときに完全な閉環ベクターを生成した。これら断片をライゲートし、SCS-1コンピテント細胞[F⁻、recA⁻、endA⁻、gryA96、thi、hsdR17、(r_k⁻、m_k⁺)、supE44、relA⁻、 λ ⁻]中に形質転換した。形質転換した細胞をアンピシリンを含有するLBプレート上にプレーティングした。うまく形質転換できた細胞は、機能性の複製開始点および β -ラクタマーゼ遺伝子を有する完全プラスミドを含んでいる場合にのみ生存しコロニーを形成することができた。

【0113】ライゲーションは、25のすべてのFokI断片のショットガンライゲーションによって行った。10mgのライゲーション混合物当たり約38の形質転換体を得られた(SCS-1細胞の全体の形質転換効率は、 5×10^7 細胞/mg高次コイルpBR322よりも大きかった[ボリバー(Bolivar)ら、Gene 2:95~113、1977に記載])。

【0114】全部で3つのコロニーをプレートから取り出した。これら3つのクローンのうち、2つは正しいAvaII制限パターンを有していた。クローンを取り出し、シーケンシングのためのCscI勾配上で単離した。複数のシーケンシングプライマーを用いて二本鎖DNA配列確認を行った。全部で1659の塩基対のうち、個々のFokIクローン中、または組み立てたプラスミド中に配列の間違ひは検出されなかった。ori領域および機能性の β -ラクタマーゼ遺伝子を含有する合成プラスミドをpWM510と称した。

【0115】プラスミド操作の第二段階では、第4図に示すFokI断片を用い、合成lacZカセット[ヤニッシュペロン(Yanish-Perron)ら、Gene 33:103~

119、1985]をpWM510のEcoRI部位にクローニングした。このカセットには、lacプロモーター、 β -ガラクトシダーゼの60アミノ酸をコードするlacZ 遺伝子断片、trpA転写ターミネーター[クリスチー(Christie)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:4180~4184、1981]および架橋突然変異誘発によるマルチブルクローニング部位を導入するためのSmaI部位を含んでいた。このクローニングによりプラスミドpWM511が得られた。lacZカセットはEcoRI開裂pWM510中に2つの方向のうちのいずれでもライゲートすることができたが、 β -ラクタマーゼmRNAまたはRNAIと同じ方向にlacZ転写単位を発現するクローンのみを回収した(試験した20クローンから)。それゆえ、pWM511中のlacZ 遺伝子断片の方向はpUCタイプのプラスミドと同じである。遺伝子合成のFokI法のクローニングベクターとして合成プラスミドを用いることができるように、 β -ラクタマーゼ遺伝子中の独特のFokI部位もまた除去した。この特別の方法は、プラスミドから小さな遺伝子断片をFokIで切断するという原理に基づいているので、プラスミド中のどの場所にもFokI部位が存在しないことが小さなFokI断片の精製を非常に容易にする。FokI部位の除去は縮重オリゴヌクレオチドを用いた架橋突然変異誘発により行い、Trp-Metアミノ酸配列を変えた。その後のシーケンシングにより、この配列はTrp-Leuアミノ酸配列に変わったことが示された。このTrp-Met配列は、1060~1064残基にあるDNA領域に対応する(第10図)。突然変異誘発に用いたオリゴヌクレオチドの配列は下記の通りであった。

GGCAACAATTAAATAGACTGGNNNGAAGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTACTpWM511プラスミドをFokIで直線状にし、架橋突然変異誘発法を用いて上記配列変化を導入した。この保存的アミノ酸変異からはアンピシリン耐性の変化が観察されなかった。

【0116】pWM515をEcoRI/SmaIで切断し、必要な塩基変化を含む合成二本鎖オリゴヌクレオチドを導入することによりEcoRI領域を欠失させた。こうして構築された合成プラスミドをpWM520と称した。架橋突然変異誘発を用いて、ファージM13mp18からのマルチブルクローニング部位(ヤニッシュペロンら、Gene 33:103~119、1985)をlacZ 遺伝子内のSmaI部位にクローニングした。このことは、pUC18のために確立した標準クローニングプロトコールに適応させるために行った。このマルチブルクローニング部位mp18を有する構築物をpWM518と称した。pWM518中のマルチブルクローニング部位は、下記の通りであった。GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT

【0117】(d)プラスミドの特徴付け：合成プラスミドの特徴付けは、この合成プラスミドが最初に完全に合成したレプリコンを構成していたため重要であった。この合成プラスミドは、その原型であるpUCタイプのプラスミドとは有意に異なっていた。この合成プラスミドは、pUCタイプのプラスミドと比較したときに、3つの欠失を含んでおり、その全長は636塩基対であり、70の点変異を有していた。pUCプラスミド中に存在する制限部位のほぼ50%が除去されていたが、このことはDNAの制限分析または精製に有利である。特に、pWM519プラスミドは、6塩基対非縮重配列を認識する制限酵素のための部位を7つしか(操作を容易にするための設計により導入した3つの部位を含む)含んでいない。pUCプラスミドでは、マルチプルクローニング部位を含まなくても、そのような部位が24存在する。そのような部位の数が少ないことにより、6塩基対特異性を有する実質的にあらゆる制限酵素をクローニング、および合成DNAでの制限断片置換または架橋突然変異誘発によりクローニング遺伝子の突然変異誘発に用いることができる。プラスミドpWM520は、75の制限酵素のための開裂部位を有していない。この合成プラスミドは、 β -ラクタマーゼ遺伝子のP1プロモーターが欠失している。この合成プラスミドは、最小の長さの複製開始点、2つの新たに導入した転写ターミネーターおよび最小の長さの操作lacプロモーターを含んでいる。

【0118】このプラスミドは、少なくとも120世代(プレート上で4継代)まで安定に増殖し得ることが示された。それゆえ、複製開始点を含む構築断片(第10図中の1349~1933)は、安定な複製を十分に維持することができた。プラスミドのコピー数は、プラスミドDNAバンドの密度をアガロースゲル上で調べ、大きなDNA調製物からDNAの収量を測定し、 β -ラクタマーゼレベルをアッセイすることにより評価した[ジョーンズ(Jones)ら、J. Clin. Microbiol. 15: 677~683, 1982]。コピー数はpUC9よりも3~4倍低く、pBR322のコピー数と等価であることがわかった。この観察結果は、pBR322と比較して最近決定されたpUCタイプのプラスミドの複製開始点の配列変化(pBR322中の2990位のGがpUCプラスミドの対応領域ではAに変わっている；ミルトン(Milton)ら、Focus, BRL-Gibco 10, 56, 1988)と一致するものであったが、これはpUCプラスミドの方に高いコピー数を与えているように思われる。

【0119】合成プラスミドの配列を第10図に示す。第10図中、転写ターミネーター、-35および-10プロモーター領域、およびfMetコードATGトリプレットには下線を引いてある。水平の矢印は転写開始部位を示す。垂直の矢印はRNaseH開裂部位を示す。アポストロフィは分割点を示し、FokI断片を与える。合

成オリゴヌクレオチドの配列は、アーム1+分割点の間の配列+4つの3'末端残基の重複+アーム2であった。FokI断片およびオリゴヌクレオチドは配列の上に示すように番号を付してある。断片1の配列は、2つの不連続な配列からなる。楔形はlacZカセットを定める。

【0120】pWM510の構築に用いるすべてのオリゴヌクレオチドの合成を、5'-ジメエトキシトリチルヌクレオシド β -シアノエチルホスホルアミダイトを用いアプライドバイオシステムズ380A合成機上で行った。合成は、平均孔径が1000Åの0.2 μ モルスケール制御孔ガラス固相上で行った。オリゴヌクレオチドの精製はゲル電気泳動により行った。

【0121】合成オリゴヌクレオチドのクローニングは、架橋突然変異誘発プロトコールにより行った。遺伝子合成のFokI法に用いた4つのすべてのクローニングベクター(pWM500, pWM501, pWM502およびpWM507)をSmaIで切断した。約50ngの直線状ベクターを30 μ lの変性緩衝液(10mM KCl, 5.0mM トリス-HCl, pH8.0, 5.0mM MgSO₄, 0.5mM ジチオトレイトール)中で20ピコモルのオリゴヌクレオチドと混合し、混合物を沸騰水浴中、100℃で3分間加熱した。試料を室温に5分間冷却し、200mlの冷却したコンピテントなJM83細胞(ara, D(lac-proAB), strA, thi, Φ 80 lacZDM15)に移した。このDNA/細胞混合物を氷上で5分間冷却し、ついで37℃で3分間熱ショックを与えた。この形質転換混合物に約2 μ lのLB培地を加え、細胞を37℃で1時間インキュベートし、ついで細胞をプレーティングした。

【0122】合成プラスミドのためのFokI断片を含むプラスミド構築物を以下のようにして設計した。約200ngの各プラスミドを90単位のFokI(ニュー・イングランド・バイオラプズ、ピバーリー、MA)で切断した。反応は、1 \times FokI緩衝液(20mM KCl, 10mM トリス-HCl, pH7.5, 10mM MgCl₂および10mM 2-メルカプトエタノール)を含有する500 μ l容量中、37℃で2.5時間行った。ついで、挿入物を含有するFokI断片をポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した。

【0123】ライゲーション手順において、25のすべてのFokI断片(各100ng)を1回の反応で一緒にした(上記)。使用したクローニングベクターのタイプは、pWM500(断片2~14のため)、pWM501(断片15~18, 24および25のため)、pWM502(断片19~23のため)、およびpWM507(断片30のため)であった。

【0124】本発明の概念を他の酵素に同様に適用できることは当業者には評価されるであろう。その際、該酵素をコードするDNAは、野生型酵素の温度安定性は保

持しながら比活性を増大させた酵素を産生するように、または野生型酵素の比活性は保持しながら温度安定性を増大させた酵素を産生するように修飾してある。本発明はまた、大腸菌以外の宿主にも適用することができる。すべての宿主が等しく有効であるわけではないが、そのような宿主の例として、バシラス属、ストレプトマイセス属、哺乳動物細胞および酵母および他の真菌類が挙げられる(これらに限られるものではない)。本明細書に記載した態様は限定を意図したものではなく単に例示を示したものにすぎず、上記および添付の特許請求の範囲に記載した発明の範囲内のすべての等価物を包含するものである。

【0125】

【図面の簡単な説明】

【図1】 アルカリホスファターゼ遺伝子を構築するのに使用する新規合成オリゴヌクレオチドの配列を示す図。

【図2】 アルカリホスファターゼ遺伝子を構築するのに使用する新規合成オリゴヌクレオチドの配列を示す図。

10

20

【図3】 アルカリホスファターゼ遺伝子を構築するのに使用する新規合成オリゴヌクレオチドの配列を示す図。

【図4】 プラスミド pMA100 の制限地図を示す模式図。

【図5】 合成野生型大腸菌アルカリホスファターゼのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す図。

【図6】 合成野生型大腸菌アルカリホスファターゼのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す図。

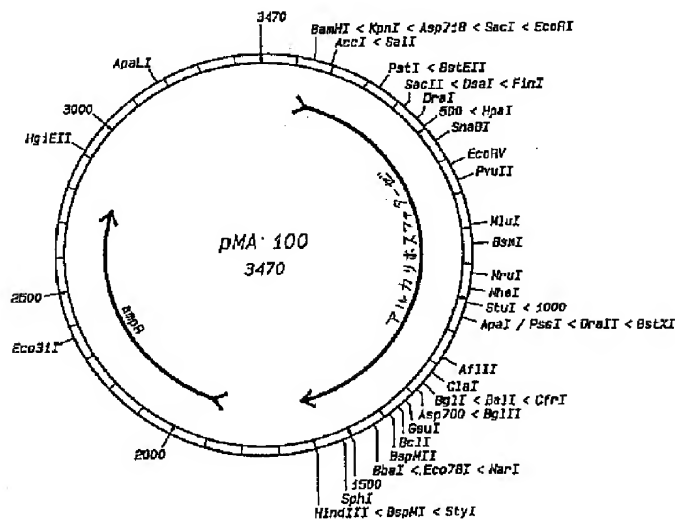
【図7】 本発明の新規指示試薬を用いて α -フェトブロテインの検出のための結合アッセイを行った結果を示すグラフ。

【図8】 本発明の新規指示試薬を用いて癌抗原の検出のための結合アッセイを行った結果を示すグラフ。

【図9】 ウシ腸管アルカリホスファターゼ結合体および大腸菌アルカリホスファターゼ結合体の可逆的熱不活化の経時変化を示すグラフ。

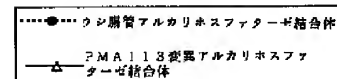
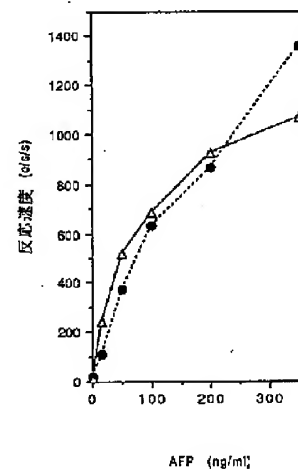
【図10】 合成プラスミド pWM520 のヌクレオチド配列を示す図。

【図4】



【図7】

ウシ腸管アルカリホスファターゼ結合体および変異大腸菌アルカリホスファターゼ結合体のアッセイ性能 (AFP 1 Mx 標準曲線)



遺伝子合成のFokI法によりアルカリホスファターゼの合成を
行うためのオリゴヌクレオチドの配列

ALK1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AGGATGCGGA	TCCCGATCT	TGTACATGGA	GAAATATAG	TGAACAGTC	GACTATTGCA	CTGGCACTCT	TACCGTCTACT	GTTTACCCGG	GAATTCACAT	CCG
ALK2	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AGGATGCGGA	TCCCGATCT	TGTACATGGA	GAAATATAG	TGAACAGTC	GACTATTGCA	CTGGCACTCT	TACCGTCTACT	GTTTACCCGG	GAATTCACAT	CCG
ALK3	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AGGATGCGGA	TCCCGATCT	TGTACATGGA	GAAATATAG	TGAACAGTC	GACTATTGCA	CTGGCACTCT	TACCGTCTACT	GTTTACCCGG	GAATTCACAT	CCG
ALK4	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AGGATGCGGA	TCCCGATCT	TGTACATGGA	GAAATATAG	TGAACAGTC	GACTATTGCA	CTGGCACTCT	TACCGTCTACT	GTTTACCCGG	GAATTCACAT	CCG
ALK5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AGGATGCGGA	TCCCGATCT	TGTACATGGA	GAAATATAG	TGAACAGTC	GACTATTGCA	CTGGCACTCT	TACCGTCTACT	GTTTACCCGG	GAATTCACAT	CCG
ALK6	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AGGATGCGGA	TCCCGATCT	TGTACATGGA	GAAATATAG	TGAACAGTC	GACTATTGCA	CTGGCACTCT	TACCGTCTACT	GTTTACCCGG	GAATTCACAT	CCG
ALK7	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AGGATGCGGA	TCCCGATCT	TGTACATGGA	GAAATATAG	TGAACAGTC	GACTATTGCA	CTGGCACTCT	TACCGTCTACT	GTTTACCCGG	GAATTCACAT	CCG

【図1】

遺伝子合成のFokI法によりアルカリホスファターゼの合成を
行うためのオリゴヌクレオチドの配列

【図2】

ALK8	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AGGATGCGGA	TCCCATCCT	GGAAATGGCA	ANAGCAGCTG	GTCTGGCGGC	CGGTAAAGTT	TCTAGCCGAG	AGTTGCAGGA	CGCCACACGG	GAATTCACAT	CCG
ALK9	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AGGATGCGGA	TCCCATCCT	GGCTGCGCTG	GTGGCAGATG	TGACTAGTCTG	CNAATGCTAC	GGTCCGAGCG	CGACCCAGTGA	AAATGTGGG	GAATTCACAT	CCG
ALK10	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AGGATGCGGA	TCCCATCCT	GGGTAAAGCG	TTCGAAAAG	CGCGAAAGG	ATCTATTAGC	GAACAGTTGC	TGAATGCTCG	TGCGGACGGG	GAATTCACAT	CCG
ALK11	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AGGATGCGGA	TCCCATCCT	TACGCTTGGC	GGCGGCGCA	AAACCTTTGC	TGAAACGCGA	ACCGCCGGCG	AATGGCAGGG	AAAACTCGG	GAATTCACAT	CCG
ALK12	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AGGATGCGGA	TCCCATCCT	TCCGCGACAG	GCACAGCCG	GTGGTTATCA	GTGGTGNGC	GATGCTGCTA	GCCTGAATC	GGTGACGGG	GAATTCACAT	CCG
ALK13	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AGGATGCGGA	TCCCATCCT	AGCGATTCAG	CAAAACCCC	TGCTAGGCTT	GTCTAGTGC	GGCAATATGC	CAGTGGCTG	GGTGCGCGG	GAATTCACAT	CCG
ALK14	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AGGATGCGGA	TCCCATCCT	CAAAAGCACT	TATCATGGCA	ATATCGACAA	GGCGGAGTC	ACTTGCAGCG	CAATTCGGCA	ACGTAAACGG	GAATTCACAT	CCG

【図3】

遺伝子合成のFokI法によりアルカリホスファターゼの合成を
行うためのオリゴヌクレオチドの配列

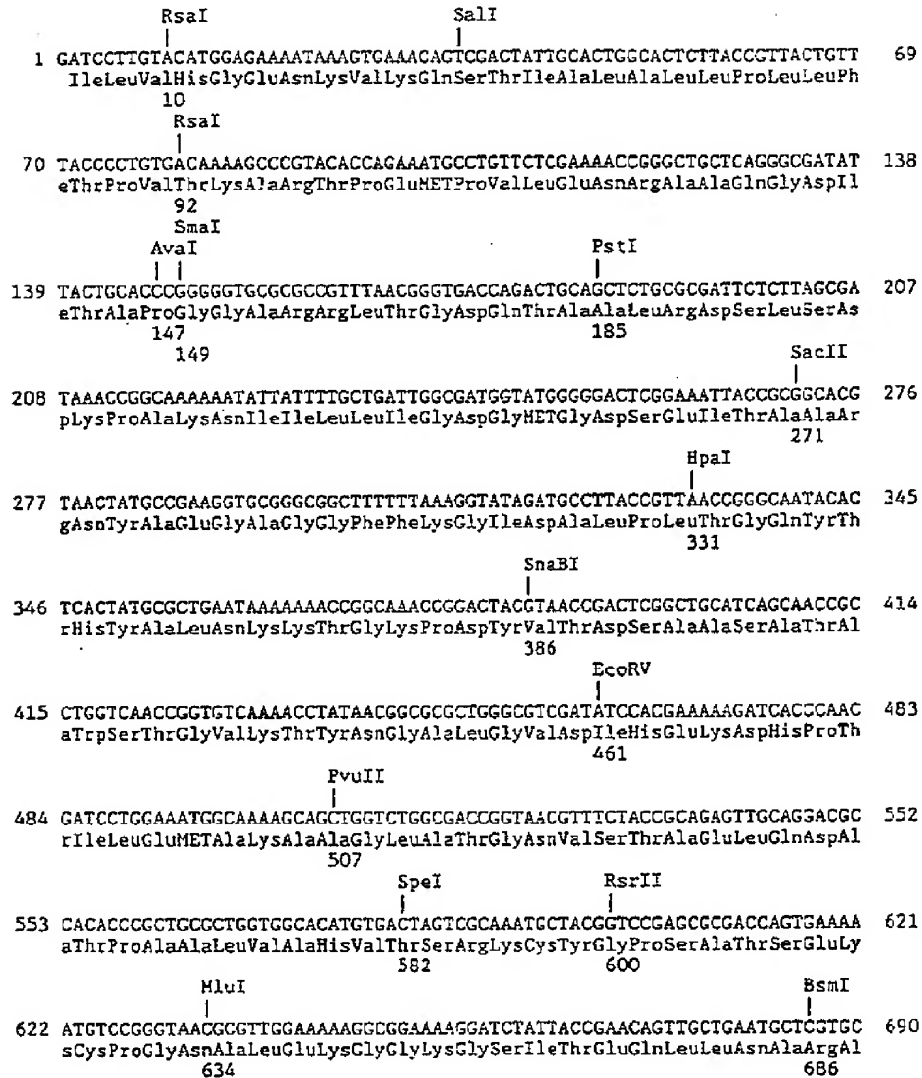
ALK15	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AGGATCGGA	TCCCAACGA	CTCGGTCCA	ACCTGCGC	AGATGACGA	CAAAGCCATT	GAATCTTAA	GTAATAATGA	GAAGGCTGG	GAATTCACAT	CCG
ALK16	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AGGATCGGA	TCCCGGCTT	TTTCTGCAA	GTTCAGGTG	CGTCATCGA	TAAACAGGAT	CATGCTCGA	ATCCTTGTG	CCAAATTTGG	GAATTCACAT	CCG
ALK17	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AGGATCGGA	TCCCATTTG	CGAGACGGA	GATCTGATG	AGCCGCTTC	ACGGGCGCTG	GAGTTGCTA	AAAGGAGGG	TACACGTGG	GAATTCACAT	CCG
ALK18	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AGGATCGGA	TCCCAAGTT	GGTCATATG	ACCGCTGATC	ACGCCACGC	CAGCCAGTT	GTTCGCTCGG	ATACCAAGC	TCCGGGTGG	GAATTCACAT	CCG
ALK19	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AGGATCGGA	TCCCGGTTT	GAACCAAGCG	CTAATATCCA	AGATGCGGC	CGTATGCTC	ATGAGTTACG	GGAATCCGA	AGAGGATAGG	GAATTCACAT	CCG
ALK20	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AGGATCGGA	TCCCGGATAG	CCAGAGCAC	ACCGGAGTC	AGTTGGTAT	TGCGGCGTAT	GGCCCGCATG	CCGCCATGT	TCTAGGCGG	GAATTCACAT	CCG
ALK21	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AGGATCGGA	TCCCGGCT	GACCGACCG	ACCGATCTCT	TCTACACCAT	GAAGCGGCC	CTTGGGCTGA	ATATATAGCA	GCTAAGCTGG	GAATTCACAT	CCG

注) 左アームの配列 - AGGATCGGATCCCC

右アームの配列 - GCGAATTCACATCCC

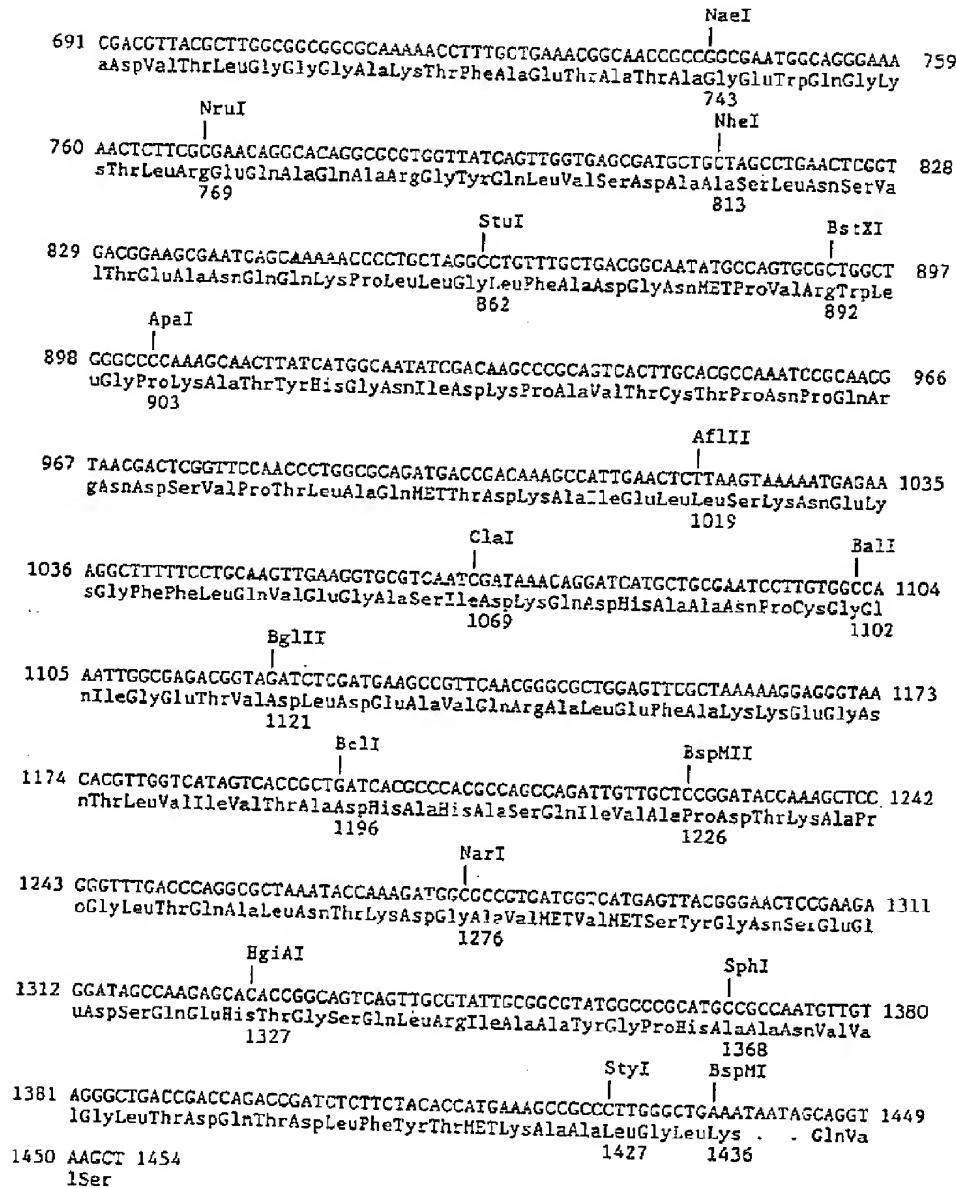
【図5】

独特の制限部位を有する合成大腸菌アルカリホスファターゼ



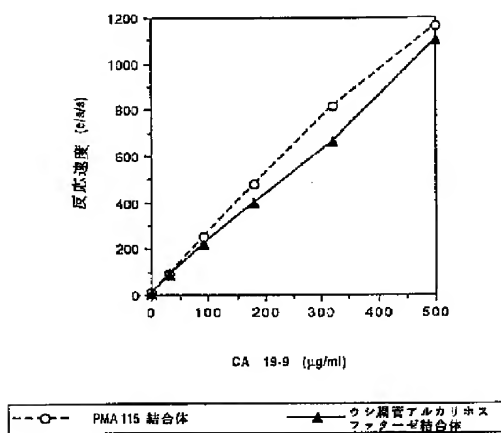
【図6】

独特の制限部位を有する合成大腸菌アルカリホスファターゼ



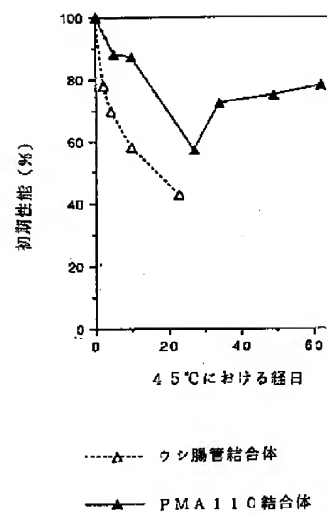
【図8】

PMA 115 アルカリホスファターゼまたはウシ腸管アルカリホスファターゼを含有する結合体のアッセイ性能



【図9】

ウシ腸管アルカリホスファターゼまたはPMA 110 アルカリホスファターゼを含有する結合体の45℃における熱安定性



【図 10】

[illegible]

技術表示箇所

—477—

C 1 2 Q 1/42

//(C 1 2 N 9/16
C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 N 15/55
C 1 2 R 1:19)

(72)発明者 スーザン・ジェイ・トマジツケーアレン
アメリカ合衆国60045イリノイ州レイク・
フォレスト、サミット・アベニュー775番